

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE DELLO SVILUPPO E
DELLA RIPRODUZIONE**

XXI CICLO

2005-2008

BIO/17 – Istologia

**Studio di marcatori epiteliali del cancro del colon-
retto mediante analisi dell'RNA con la tecnica del
microarray**

Dott.ssa Mattia Lauriola

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Elisabetta Caramelli

Relatore

Dott.ssa Rossella Solmi

Dipartimento di Istologia Embriologia e Biologia Applicata

Bologna, Marzo 2009

Introduzione

Il carcinoma del colon-retto	2
Genetica del cancro del colon	7
Progressione adenoma-carcinoma	8
Cancro del colon-retto ereditario	11
Il ruolo di APC e di β -catenina nei tumori del colon-retto	13
Il ruolo di EGFR (recettore per il fattore di crescita epidemico) nei tumori del colon-retto	16
Metodi di screening del cancro del colon-retto	17
Test del sangue occulto nelle feci (FOBT)	18
Esami di indagine endoscopica	19
Enteroclasma al bario	20
Colonscopia virtuale	20
Metodi di analisi molecolare	21
Marcatori molecolari comunemente studiati	21
CEA	21
Citocheratine	22
EGFR (Recettore del fattore di crescita epidermico)	22
Teoria delle cellule tumorali circolanti (CTCs)	23
MicroRNA	26
miRNA biogenesi e meccanismo d'azione	26
miRNA oncogeni e oncosoppressori	28
MicroRNA biomarcatori	29
Microarray	30

Scopo della Ricerca	34
I - Parte : Ricerca di mRNA epitelio specifici	35
II- Parte: Ricerca di mRNA bersaglio di EGFR	36
III- Parte: Ricerca di microRNA marcatori del cancro del colon	37
 Materiali e Metodi	 38
Pazienti	39
Estrazione automatizzata dell'RNA totale	40
Estrazione dell'RNA totale con Trizol–Invitrogen.	41
Retrotrascrizione (RT)	42
Retrotrascrizione (RT) per microRNA	42
Progettazione dei primer	43
Reazione a catena della polimerasi (PCR)	44
Real Time qPCR	45
DNA microarray	46
Acquisizione immagine dagli array	47
MicroRNA microarray	48
Analisi dei dati	48
Colture cellulari	50
Saggi di vitalità cellulare	51
Analisi del ciclo cellulare	51
Immunistoichimica	51
Valutazione semiquantitativa dell'EGFR	52
Microscopia elettronica a scansione (SEM)	53
Western blot	53

Northern blot	54
Trasfezione	55
Trasfezione transiente con lipofectamina	56
Risultati	59
I – Parte: Ricerca di mRNA epitelio specifici	60
Ricerca di mRNA epitelio specifici mediante microarray	60
Validazione dei candidati marcatori mediante analisi di RT-PCR	62
II – Parte: Ricerca di mRNA bersaglio di EGFR	
Saggi di vitalità cellulare in seguito all’attivazione/blocco di EGFR	66
Analisi del ciclo cellulare in seguito all’attivazione/blocco di EGFR	68
Immunocitochimica in seguito all’attivazione/blocco di EGFR	70
SEM (Microscopia elettronica a scansione)	75
Analisi con microarray	79
Heatmap	82
Geni accesi da EGFR	83
III – Parte: Ricerca di microRNA marcatori bersagli di APC	
Espressione della forma completa di APC	85
Profili d’espressione di microRNAs mediante microarray	87
Analisi dei dati dei microRNAs microarray	88
Espressione di c-Myc	91
APC reprime l’espressione di hsa-miR-20	92
Studio della famiglia microRNAs hsa-mir-200	93
Quantificazione di hsa-miR-200 mediante qPCR Real Time	94

Studio del promotore di miR-200 e ricerca di sequenze consenso per il	
legame di fattori di trascrizione TCF/LEF	96
β -catenina induce miR-200a	98
Discussione e conclusioni	99
Appendice	110
Ringraziamenti	121
Bibliografia	122

Capitolo 1

Introduzione

Il carcinoma del colon-retto

Il carcinoma del colon retto rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei paesi occidentali. La sua incidenza è in aumento in tutto il mondo. Solo in Europa sono diagnosticati ogni anno 200.000 nuovi casi [1].

Tale neoplasia è rara prima dei 40 anni, presentandosi più frequentemente intorno ai 60 anni. L'incidenza nei due sessi non mostra differenze per quanto riguarda la localizzazione colica, mentre a livello rettale sembra essere leggermente più frequente nel sesso maschile. Le sedi più colpite sono il retto (50% dei casi) ed il sigma (20% dei casi), mentre il colon ascendente ed il trasverso con la flessura splenica sono interessati rispettivamente nel 16% e nell'8% dei casi [1]

Il cancro colon-rettale è chiamato cancro del colon o cancro rettale e si riferisce a tutte le forme di cancro che hanno inizio dal cieco e finiscono al retto.

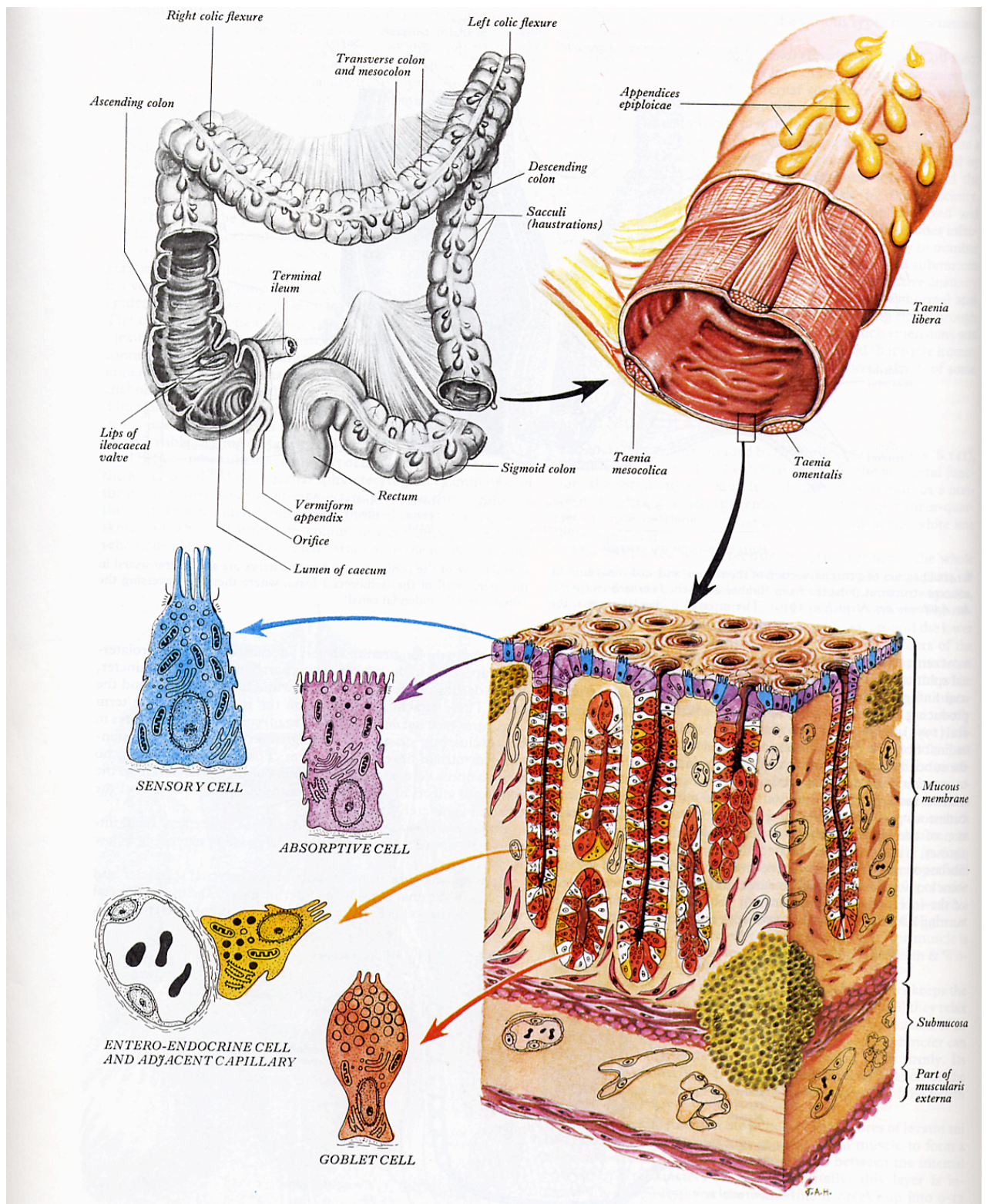


Figura 1: Rappresentazione schematica delle principali regioni dell' intestino crasso, della micro-architettura e dell'istologia delle pareti con l'ultrastuttura delle sue cellule epiteliali. Anatomia del Gray – Zanichelli.

Dalle stime effettuate dal Reparto Epidemiologia dei Tumori del Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità i tassi di incidenza, così come quelli di mortalità, variano da regione a regione, ma innanzitutto tra nord e sud del paese (tabella 1). I motivi che possono spiegare queste differenze sono da ricercare, principalmente, nell'influenza del regime alimentare. E' ormai acquisito, infatti, che una dieta ricca di cereali, fibre, verdure e povera di grassi animali esplica un'azione protettiva nei confronti di questa neoplasia. Nelle regioni del nord rispetto a quelle del sud, infatti, si consumano più proteine animali e meno fibre, sebbene in questi ultimi tempi queste differenze tendano progressivamente a ridursi, (Reparto Epidemiologia dei Tumori del Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità rapporto 2008) [2].

Tabella 1. Tumore del colon-retto: Stime di incidenza al 2008.

AREA	Uomini			Donne		
	Numero Casi	Tasso grezzo	Tasso std	Numero Casi	Tasso grezzo	Tasso std
Piemonte	1776	90	53	1319	65	31
Valle d'Aosta	47	82	53	35	61	31
Lombardia	4472	104	69	3251	73	39
Trentino Alto Adige	496	108	80	344	74	44
Veneto	2522	118	80	1776	81	44
Friuli Venezia Giulia	713	133	80	508	91	44
Liguria	735	104	54	625	83	34
Emilia Romagna	2423	134	76	1539	82	40
Toscana	1688	106	59	1038	62	30
Umbria	458	120	67	309	78	37
Marche	736	109	63	473	68	36
Lazio	2158	87	57	1478	56	31
Abruzzo	635	106	68	267	43	23
Molise	163	107	68	68	43	23
Campania	1887	65	57	1209	41	28
Puglia	1305	65	49	871	42	26
Basilicata	288	98	66	165	56	32
Calabria	779	78	56	369	36	22
Sicilia	1673	68	50	1152	45	28
ITALIA	28233	103	69	19379	68	38

Fonte: I dati sono stimati dal Reparto Epidemiologia dei Tumori del Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità.

Tasso grezzo: calcolato come rapporto tra casi e popolazione, per 100.000.

Tasso standardizzato (std): tasso corretto per età utilizzando come standard la popolazione europea Età: 0-84. Anno 2008.

I fattori di rischio conosciuti sono:

- Storia familiare di polipi adenomatosi
- Morbo di Crohn
- Malattie infiammatorie intestinali (IBD)
- Sindrome del colon irritabile
- Coliti Ulcerose
- Storia personale e/o familiare di cancro colo-rettale

I possibili fattori di rischio sono:

- Ambiente
- Dieta (ricca di grassi e colesterolo, povera di fibre)
- Fumo
- Età sopra i 50 anni
- Mancanza di attività fisica

Il 70% dei pazienti si presenta alla diagnosi con malattia chirurgicamente aggredibile, il 30% con malattia metastatica; il 25% dei pazienti operati radicalmente presenterà una recidiva della malattia dopo un tempo variabile [3].

La sopravvivenza dei pazienti è sicuramente influenzata dallo stadio del tumore alla diagnosi per cui, mentre i pazienti con lesioni confinate alla parete intestinale hanno una probabilità di sopravvivenza a 5 anni del 75%, quelli con metastasi a distanza hanno solo una probabilità del 5-10%. Sfortunatamente la maggior parte dei casi di cancro del colon-retto è individuata quando la neoplasia ha già dato metastasi regionali o a distanza, dal momento che questi tumori restano asintomatici fino agli ultimi stadi [3].

Genetica del cancro del colon

Dal punto di vista genetico-molecolare si distinguono due principali modelli di sviluppo del carcinoma coloretale. Il primo e più frequente (85% dei casi) è caratterizzato da instabilità cromosomica, con marcate alterazioni del cariotipo, frequenti delezioni alleliche, aneuploidia ed inattivazione dei geni oncosoppressori, APC (*Adenomatosis poliposis coli*), KRAS, geni localizzati sul braccio lungo del cromosoma 18 (DCC, SMAD2 e SMAD4) e della proteina p53. Questi tumori progrediscono secondo la sequenza adenoma-carcinoma teorizzata inizialmente da Bert Vogelstein nel 1988, prendendo origine dai comuni adenomi colo-rettali [4].

Il secondo è caratterizzato da instabilità dei microsatelliti (MSI) e comprende i tumori insorti in pazienti con HNPCC (cancro del colon ereditario non poliposico) ed il 10-15% dei carcinomi sporadici. I carcinomi con MSI (o più precisamente MSI-H) presentano modeste alterazioni del cariotipo, contenuto nucleare di DNA diploide, infrequenti delezioni alleliche ed alterazioni del gene TP53, e tendono, per contro, ad accumulare mutazioni in brevi sequenze ripetute presenti nella porzione codificante di numerosi geni, quali TGFβRII, BAX, IGFR1I. La MSI-H è determinata dal deficit del sistema di riparazione del DNA "DNA mismatch repair" (MMR), nella grande maggioranza dei casi per inattivazione dei geni MLH1 o MSH2 ed in particolare nei carcinomi sporadici è quasi sempre determinata da metilazione del promoter di MLH1. La sequenza adenoma-carcinoma è operante anche nella genesi dei tumori MSI-H ereditari, nei quali la progressione da adenoma a carcinoma si verifica più rapidamente, mentre l'istogenesi dei carcinomi MSI-H sporadici è ancora indeterminata. Recenti studi sembrano, comunque, indicare nei polipi iperplastici e negli adenomi serrati i principali precursori morfologici di queste neoplasie ("serrated neoplasia pathway") [4].

Progressione adenoma-carcinoma.

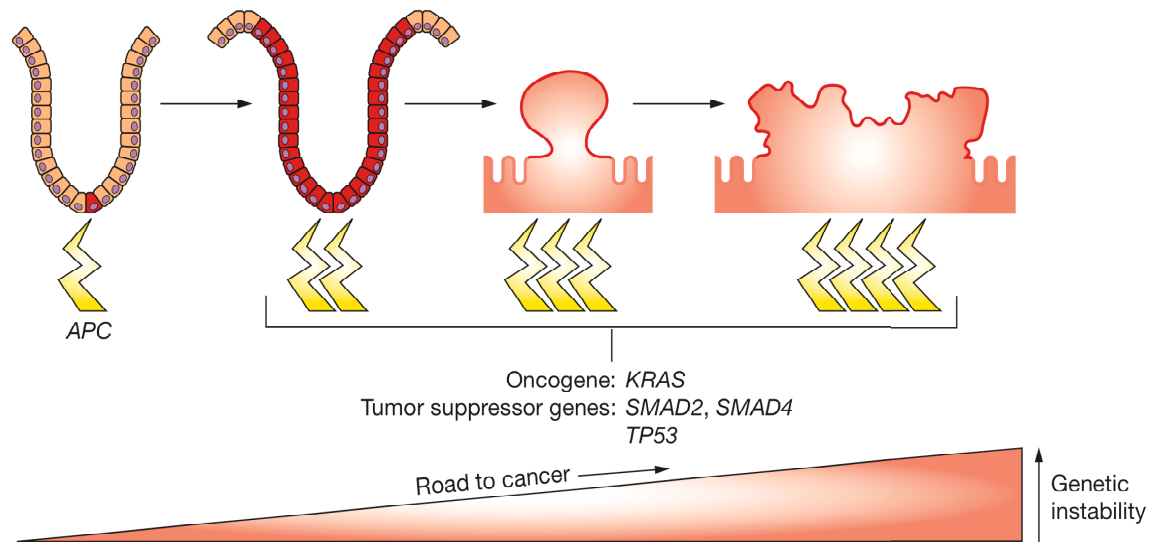


Figura 2. Adattamento della progressione adenoma-carcinoma secondo il modello “bottom-up”. Fonte: [5].

La progressione adenoma carcinoma, ampiamente studiata nell'istogenesi del cancro del colon, gode di due teorie rappresentative tra loro discordanti. La prima, conosciuta come ‘bottom-up’ (ovvero ‘dal basso verso l’alto’) [6], fa partire la trasformazione neoplastica dalle cellule staminali, localizzate alla base della cripta, che, in seguito ad accumulo di mutazioni a carico di specifici geni, innescano un processo iperproliferativo e si espandono verso la regione apicale/luminale della cripta. Ad oggi non ci sono evidenze scientifiche di tale processo, né sono stati chiariti i meccanismi molecolari responsabili. Pertanto il dibattito sull'origine degli adenomi rimane aperto. Lo stesso Volgestein, comunque, è tra i maggiori sostenitori di una seconda teoria, in disaccordo con

l'origine staminale del cancro coloretale; la teoria del 'top-down', ovvero 'dall'alto verso il basso' [7].

Questa teoria partiva dall'analisi di cripte displastiche in 35 piccoli tumori coloretali, in cui erano valutate: le mutazioni su APC, il cambiamento dell'architettura proliferativa (KI67), e l'attivazione della della beta catenina nucleare. I risultati di tali analisi mostravano che tutte le aberrazioni che inconfutabilmente identificavano le cellule displastiche apparivano confinate in alto, verso il lume intestinale, mentre, sorprendentemente, le basi della cripta apparivano morfologicamente normali, con una forte linea di demarcazione tra cellule normali e neoplastiche.

Per conciliare queste nuove evidenze con la teoria della cellula staminale tumorale è stato anche ipotizzato che i precursori delle cellule displastiche fossero localizzati in una zona inter-cripta o che le cellule staminali neoplastiche della cripta esibissero il loro carattere displastico solo quando ne raggiungevano l'apice.

La figura 3 mette a confronto i modelli "top-down" e "bottom-up", in una rappresentazione schematica [5].

Bottom-Up

Top-Down

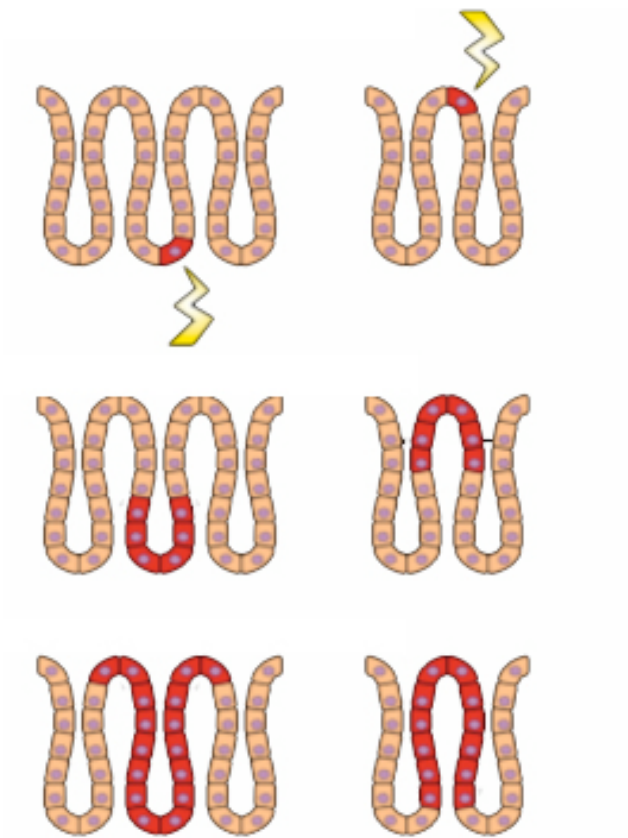


Figura 3: Rappresentazione schematica dei due modelli top-down e bottom-up nell'istogenesi delle cripte del colon. Fonte [5].

Cancro del colon-retto ereditario

Almeno il 15% dei cancri colon-rettali si manifesta secondo il modello dell'ereditarietà autosomica dominante.

Le due forme meglio caratterizzate sono la FAP (poliposi adenomatosa familiare) e HNPCC (cancro coloretale ereditario non poliposico). [4-5] Pazienti con FAP, tipicamente, sviluppano centinaia di migliaia di tumori coloretali.

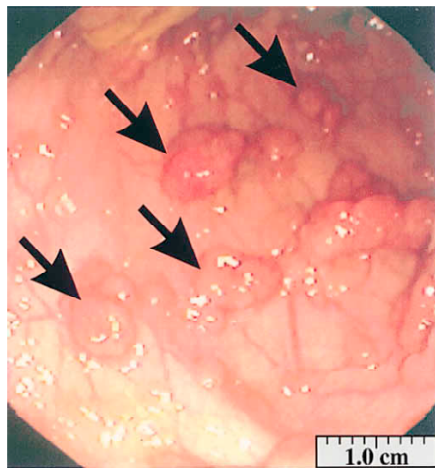
Questi tumori, benigni, non sono individualmente trattabili, e pertanto la loro numerosità garantisce che alcuni progrediscono in lesioni invasive, chiamate appunto carcinoma o cancro. La FAP è conosciuta già dalla metà del diciottesimo secolo e la sua natura ereditaria era già stata descritta e riconosciuta nel diciannovesimo secolo. In ogni caso è stato solo negli ultimi 15 anni che si è delucidata la sua patogenesi molecolare. Il primo fattore citogeneticamente evidente è stato la delezione del braccio lungo del cromosoma 5 in pazienti FAP [8]. Questa osservazione ha stimolato studi molecolari che hanno dimostrato una stretta associazione tra la regione 5q21 e la malattia. In seguito allo studio delle alterazioni germinali nei pazienti affetti da FAP e delle alterazioni somatiche nei cancri coloretali sporadici è stato possibile identificare il gene APC e mostrare che fosse responsabile della FAP dimostrando la cosegregazione di alleli mutanti APC in parenti affetti.

Perciò studi su pazienti affetti da FAP e modelli murini con analoga mutazione dell'omologo APC hanno suggerito che il fattore limite nell'iniziazione del tumore è una mutazione somatica dell'allele selvatico ereditato da un genitore affetto.

La piccola frazione di cellule staminali epiteliali coloretali che diventa neoplastica è in ragionevole accordo con il basso numero di mutazioni somatiche di APC che ci aspettiamo nelle cellule di colon normale. E' quindi fornito un forte supporto alla teoria

del “doppio colpo”, originariamente utilizzata per spiegare l’incidenza familiare e non familiare dei tumori infantili [9].

Un altro principio generale mostrato dalla FAP è la complessa relazione tra genotipo e fenotipo. I pazienti affetti da FAP non sviluppano un quadro clinico uniforme, nonostante tutti abbiano mutazioni sullo stesso gene (APC) e nella stessa regione C terminale.



FAP



HNPCC

Figura 4: Esempi di tumori colo-rettali che originano da FAP e HNPCC. A sinistra osserviamo una piccola frazione di colon visualizzata in colonscopia, sono evidenziati i tumori benigni multipli (adenomi) di un paziente con FAP. Il pannello di destra mostra un singolo cancro da paziente con HNPCC dopo resezione chirurgica. Fonte [4].

Il ruolo di APC e di β -catenina nei tumori del colon-retto

Il gene Adenomatous Poliposis Coli (APC) codifica per una proteina di 2843 aminoacidi. La proteina APC è localizzata sulla membrana baso-laterale nelle cellule coloretali epiteliali, con un'espressione sempre più pronunciata nella migrazione delle cellule lungo la colonna dalla cripta. La mutazione di questo oncosoppressore è responsabile del primo passaggio nella trasformazione da epitelio normale a iperproliferante [10].



Figura 5: Istologia di un epitelio di colon normale e patologico in sezione trasversale. Nel pannello di sinistra si notano che le cellule epiteliali precisamente allineate lungo la membrana basale e l'enorme uniformità delle ghiandole. Il pannello centrale mostra una morfologia tipica della lesione iperplastica. Le cellule individualmente sono normali, ma l'aumento del loro numero nelle cripte promuove l'affollamento e il ripiegamento della mucosa. Il pannello di destra mostra una morfologia tipica delle cripte a foci aberranti (ACF) che si crede siano i precursori degli adenomi. Aumenta il rapporto nucleo/citoplasma, molti nuclei non sono più allineati lungo la membrana basale, è evidente la mancanza di un'architettura uniforme [4].

La regione aminoterminalale contiene numerose ripetizioni che sono responsabili dell'oligomerizzazione e dell'effetto dominante negativo. Sono state identificate due proteine che legano la regione carbossi-terminale: EB-1 (di funzione sconosciuta) e DLG, un altro oncosoppressore [11].

Le zone centrali comprendono due siti di legame per β -catenina, una proteina dalla duplice funzione: la prima strutturale e la seconda di fattore di trascrizione (Fig.6).

β -catenina è, infatti, un componente fondamentale delle giunzioni aderenti, lega il citoscheletro a proteine di membrana calcio-dipendenti della famiglia delle caderine.

Inoltre β -catenina media il segnale del proprio accumulo e conseguente traslocazione nel nucleo. I livelli di β -catenina nella cellula sono regolati dalla sua associazione con il complesso APC, assina e glicogeno sintasi chinasi 3β . La fosforilazione di β -catenina da parte del complesso APC–assina–GSK- 3β ne comporta la sua degradazione; attraverso la via ubiquitina–proteasoma. Di conseguenza, l'espressione di una forma mutante di uno qualunque dei membri del complesso, ne comporta l'accumulo in primo luogo a livello citosolico [12-13].

Quando i livelli di β -catenina citoplasmatica raggiungono valori sufficientemente elevati, β -catenina può traslocare nel nucleo, legare i membri della famiglia di fattori di trascrizione Tcf/Lef e quindi regolare l'espressione di specifici geni, molti dei quali coinvolti in processi di proliferazione cellulare, come c-myc e ciclina D1 [14].

Dato che il legame di β -catenina ad APC o caderine è mutuamente esclusivo, è probabile che APC possa sia modulare l'adesione che controllare indirettamente l'espressione dei geni bersaglio di β -catenina [15].

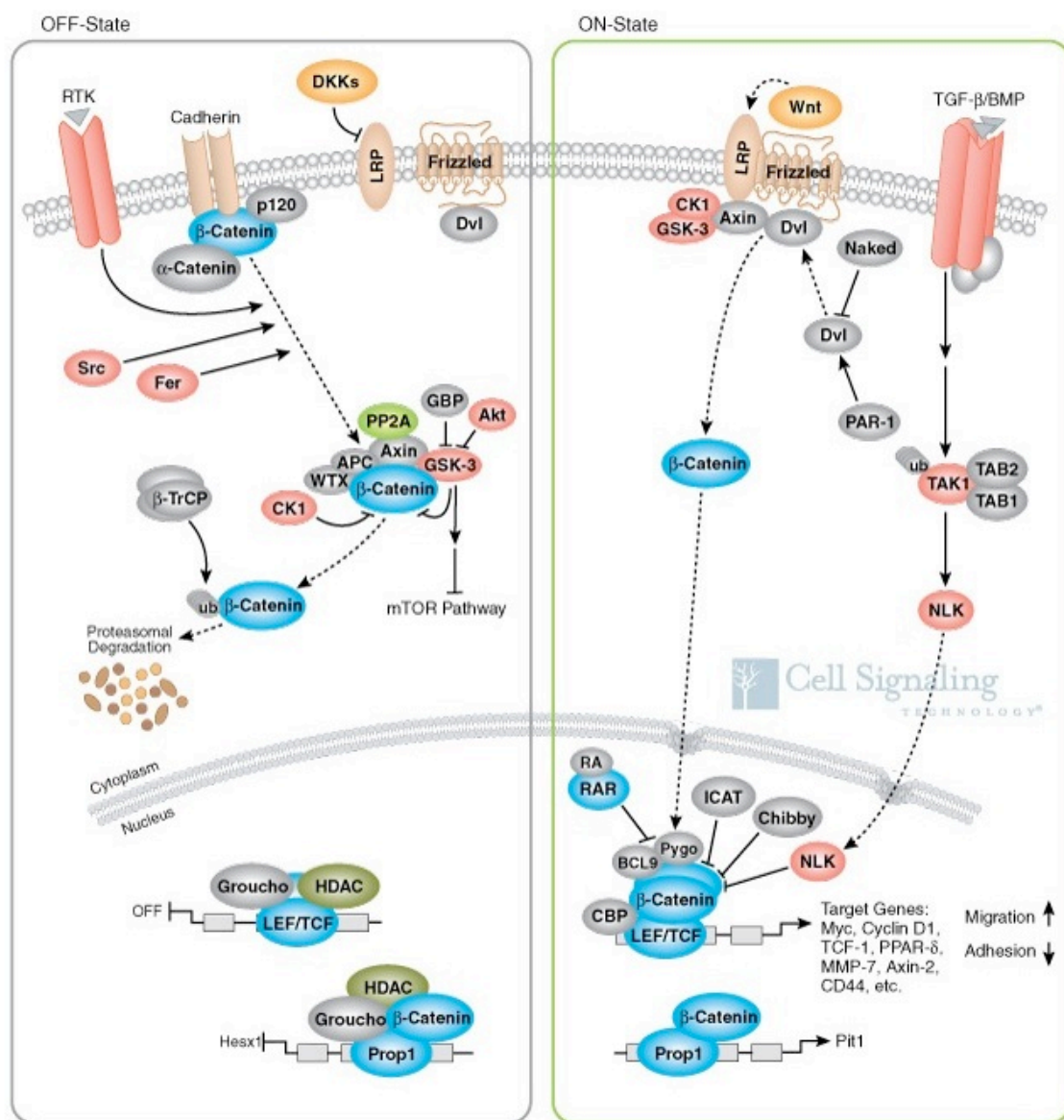


Figura 6: Via di segnalazione cellulare della β -catenina.

http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt_beta_Catenin.html

Il ruolo di EGFR (recettore per il fattore di crescita epidemico) nei tumori del colon-retto

Fino all'80% dei cancro colorettali sono caratterizzati dall'espressione aberrante dell'EGFR (recettore per il fattore di crescita epidermico). La sua attività è stata associata a numerose vie, tra cui la sopravvivenza cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi, la motilità e l'invasione [16].

La sua struttura molecolare, comune agli altri 3 membri (ErbB2 o HER2/neu, ErbB3, ErbB4) della famiglia dei recettori ErbB include una regione extracellulare, un dominio transmembrana ed un dominio tirosino-chinasico [17]. La regione extracellulare è deputata al legame dell'EGF (fattore di crescita epidermico). Il legame di EGF determina la dimerizzazione di EGFR o con altre molecole di EGFR (omodimerizzazione) o con altri recettori strettamente correlati (eterodimerizzazione), quali, per esempio, HER2/neu [19]. Segue una fosforilazione del dominio tirosino-chinasico che innesca vie di segnalazione intracellulare relative alla proliferazione cellulare ed al differenziamento [18].

EGFR è attivato impropriamente in molti tumori epiteliali ed è frequentemente sovraespresso nel cancro del colon. Il livello di espressione/attivazione di EGFR correla con una mancata risposta ai farmaci, con la progressione della malattia e con una minore sopravvivenza [20].

Nel 1980 si è iniziato a considerare il percorso di segnalazione dell'EGFR quale potenziale bersaglio per la terapia del cancro [21,22]. Le strategie maggiormente adottate per il blocco dell'EGFR sono state due: anticorpi monoclonali (Mabs) che competono con l'EGF per il legame al dominio extracellulare ed inibitori del dominio tirosino chinasico a

basso peso molecolare (TKIs) che agiscono impedendo il legame dell'ATP al suddetto dominio [23].

Metodi di screening del cancro del colon-retto

Dal momento che le opzioni di trattamento per pazienti in uno stadio avanzato della malattia sono limitate, mentre le prospettive di sopravvivenza in uno stadio iniziale sono maggiori, risulta di fondamentale importanza riuscire a diagnosticare precocemente il cancro del colon-retto e quindi mettere a punto una metodica da utilizzare come test di screening nella popolazione.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha sviluppato i criteri che devono essere considerati per lo sviluppo o l'applicazione di un test di screening per il cancro: accettabilità, praticità, accessibilità. Infine perché un test di screening sia efficace deve avere un'alta specificità ed un'alta sensibilità [24]. Per specificità si intende la probabilità che il test sia negativo in persone che non hanno la malattia, per cui un test con bassa specificità determinerebbe un'alta percentuale di falsi positivi con conseguente aumento dei costi e compromissione della sua efficacia. Per alta sensibilità si intende invece la probabilità che il test risulti positivo in persone che hanno la malattia; l'efficacia di un test di screening non può essere superiore alla sua sensibilità poiché a seguito di un falso negativo l'individuo perde la possibilità di sottoporsi al trattamento.

Fortunatamente il periodo di tempo che intercorre dall'insorgere della lesione pre-neoplastica fino allo sviluppo del tumore maligno è di 5-10 anni. Questo lungo periodo di tempo fornisce un'opportunità di intervento poiché, riuscendo ad individuare gli adenomi e rimuovendoli, si evita il progredire della patologia. In realtà gli adenomi sono abbastanza frequenti e in particolare, nelle società occidentali, colpiscono circa il 30%

degli individui adulti; non tutti gli adenomi evolveranno in cancro. E' certamente importante essere in grado di predire gli adenomi che progrediranno in senso maligno, ma ancora più importante è individuare i portatori di tali lesioni pre-neoplastiche. Poiché, quando si manifestano i sintomi, spesso la malattia è già in fase avanzata ed ormai incurabile, si comprende quanto sia importante la messa a punto di una metodica per un test di screening, che individui e salvi la vita a questo tipo di pazienti.

Infatti, ricerche condotte per più di due decenni hanno supportato l'efficacia dello screening per il cancro del colon-retto, nella riduzione della mortalità. Al momento diversi sono i test di screening proposti, ma tutti, sebbene disponibili da decenni, sono scarsamente applicabili alla popolazione in generale. Questo a causa di numerosi ostacoli, inclusi i costi, la mancanza di attrezzature e di personale medico preparato, l'avversione per le procedure di screening e il disagio da parte del paziente per le modalità di svolgimento degli esami. Tra le modalità di screening citiamo brevemente le principali:

Test del sangue occulto nelle feci (FOBT)

E' un esame piuttosto semplice, facilmente applicabile ed economico, che si fonda sul presupposto che la maggior parte delle lesioni neoplastiche causi sanguinamento della parete intestinale sin dalle prime fasi di sviluppo. Con questa base razionale, campioni di feci sono analizzati in laboratorio per la presenza di quantità anche microscopiche di sangue. Il FOBT è il test di screening per il carcinoma del colon-retto con la più solida prova di efficacia, in quanto la sua applicazione risulta studiata da decenni. L'indagine precoce tende a determinare una diminuzione della mortalità. Prove cliniche randomizzate e controllate su più di 258.000 pazienti condotte nel Regno Unito, in Danimarca e negli Stati Uniti (Minnesota) mostrano una riduzione statisticamente significativa della mortalità dovuta al cancro del colon-retto negli individui sottoposti

regolarmente all'analisi del sangue occulto nelle feci. L'efficacia peraltro dipende dalla frequenza dei controlli, comunque non è mai superiore al 30%.

Inoltre, il FOBT sembra essere poco sensibile (la percentuale di individuazione della presenza di cancro varia dal 25% al 90%, anche perché la maggior parte degli adenomi non sanguina), ed ha una bassa specificità, con un'elevata incidenza di falsi positivi che implicano costi supplementari per indagini mediche più approfondite (si è calcolato che l'incidenza di FOBT-positivi nella popolazione, in generale, si aggira intorno al 2-9%, ma soltanto il 5% dei soggetti positivi al test presenta cancro del colon-retto invasivo) [25].

Esami di indagine endoscopica

Un' alternativa alla ricerca indiretta della presenza del cancro (FOBT) è la visualizzazione diretta della parete intestinale, allo scopo di individuare polipi adenomatosi precancerosi o il cancro, tramite un approccio di tipo endoscopico.

Due sono le principali metodiche endoscopiche utilizzate: la prima tra queste è la sigmoidoscopia, che prevede l'introduzione di uno strumento ottico attraverso il retto per esaminare direttamente il colon. Per valutare l'efficacia del test, due studi caso-controllo hanno mostrato una buona riduzione della mortalità per il cancro del colon-retto (dal 65% al 90%) nei pazienti sottoposti preventivamente a tale esame [26; 27]. Tuttavia, a fronte di una buona efficacia, di una relativa semplicità e sicurezza, e di costi non troppo elevati per lo svolgimento della procedura, la principale barriera all'impiego di questo tipo di esame come test di screening su larga scala è il disagio del paziente per le modalità dell'esame stesso. Sebbene oggi tale disagio sia stato notevolmente ridotto dalla sostituzione del rigido proctoscopio con un sigmoidoscopio flessibile, la tolleranza dei pazienti resta bassa. Altro problema è che la sigmoidoscopia esamina solo metà del colon,

non riuscendo a raggiungere il colon prossimale [28]. In realtà è stato osservato che la maggior parte delle lesioni cancerose insorge nel colon distale, pertanto questo test individua almeno il 70-85% dei tumori. Il rischio di presenza di un adenoma precanceroso o del cancro, a livello prossimale, è dell'1-2% in un individuo con sigmoidoscopia negativa.

L'altra metodica endoscopica utilizzata, la colonscopia, è sicuramente più sensibile e negli Stati Uniti è considerata l'indagine ottimale per individuare il cancro del colon-retto, essendo capace di individuare lesioni anche nel colon prossimale [29]. Il problema principale, oltre ad un aumento del rischio di complicazioni, è tuttavia l'eccessivo costo di questo tipo di esame, a fronte di un incremento delle percentuali di diagnosi non sufficientemente elevato rispetto all'impiego della sigmoidoscopia. Una strategia proposta è l'uso della colonscopia nei soggetti a maggior rischio, quali quelli sopra i 65 anni di età, e quelli già risultati positivi al FOBT o alla sigmoidoscopia.

Enteroclisma al bario

L'enteroclisma al bario è un test radiologico nel quale il bario è infuso attraverso un clistere nell'intestino e vengono effettuate foto radiografiche per identificare polipi o il cancro. Sebbene l'enteroclisma al bario sia indicato per l'indagine del cancro del colon-retto pochi sono i risultati a supporto della sua efficacia. Diversi studi hanno evidenziato significativi problemi relativi alla sensibilità di evidenziazione dei polipi.

Colonscopia virtuale

La colonscopia virtuale è una tecnica che utilizza una scansione tomografica computerizzata a spirale per creare immagini bidimensionali e tridimensionali simulate della superficie luminale del colon. Questo esame mostra sensibilità e specificità elevate,

individuando l'80-90 % dei polipi di maggiori dimensioni, con una specificità del 90-100 % [30], e del 60-65 % per i polipi di minori dimensioni.

Il costo della colonscopia virtuale è alto (il 50% in più rispetto alla colonscopia standard), e l'analisi dei dati può richiedere da 10 minuti a 1 ora; per questo sembrerebbe improponibile il suo utilizzo come test di screening.

Metodi di analisi molecolare

Infine è necessario citare un filone di ricerca, d'interesse prettamente biotecnologico e peraltro non ancora ben sviluppato, volto ad individuare marcatori molecolari da utilizzare per l'identificazione di pazienti con cancro del colon-retto [31-32].

Marcatori molecolari comunemente studiati

Il marcatore ideale dovrebbe essere un trascritto espresso in tutte le cellule tumorali di un dato tumore, ma non nelle cellule normali. Infine l'elevata sensibilità dei saggi di PCR richiede controlli strettamente negativi per validare i segnali positivi di PCR.

Invero, se il gene bersaglio è un tipico gene espresso nelle cellule epiteliali (per esempio citocheratine), il segnale potrebbe essere un falso positivo se il paziente ha cellule epiteliali non-tumorali circolanti.

CEA

Il gene *CEA* è un marcatore ampiamente espresso nelle cellule cancerose di tumori solidi [32-33], arriva ad essere espresso fino al 95% dei casi di cancro del colon, e la sua espressione è inversamente correlata alla sopravvivenza. Il *CEA* contribuisce alla metastatizzazione, ha funzione adesiva e protegge le cellule dall'apoptosi.

I livelli della proteina CEA nel siero sono spesso utilizzati per seguire l'andamento di una terapia, anche se raramente i livelli sono sufficientemente alti da essere rilevati [34].

Citocheratine

Le citocheratine appartengono ai filamenti intermedi e possono essere divise in 5 classi a seconda delle loro caratteristiche biochimiche. L'espressione di queste proteine correla strettamente con il programma di differenziamento cellulare ed è stabile dopo la trasformazione neoplastica, al punto da diventare ulteriori marcatori nella classificazione istologica dei tumori. La CK19 (*citocheratina 19*) è stato il primo marcatore tumorale individuato nel sangue delle pazienti con cancro mammario. La CK20 (*citocheratina 20*), è un altro potente marcatore tumorale, espresso in maniera selettiva nel cancro coloretale, gastrico e pancreatico [35-36].

EGFR (Recettore del fattore di crescita epidermico)

L'mRNA dell'EGFR è stato descritto come un marcatore altamente specifico per la selezione di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico di malati metastatici [37].

Questo marcatore risultava sicuramente meno sensibile delle citocheratine già individuate, ma altamente specifico. Dai primi studi sembrava essere completamente assente nei controlli sani [38].

In realtà ulteriori controlli hanno evidenziato che nessuno di questi marcatori risultava essere ideale, a causa della scarsa specificità di alcuni e soprattutto della positività riscontrata in troppi controlli sani. Le possibili spiegazioni sono state ricercate o in una contaminazione del sangue prelevato (da cellule epiteliali introdotte durante l'inserimento dell'ago) o da un punto di vista più molecolare, nell'induzione dell'espressione di geni

tessuto specifici in cellule ematopoietiche da secrezione di citochine, fenomeno noto come trascrizione illegittima [39-40].

Teoria delle cellule tumorali circolanti (CTCs).

Una certa percentuale di cellule tumorali è sottoposta a circolazione spontanea, un evento cruciale del “comportamento invasivo” [41]. L’individuazione delle cellule tumorali circolanti (CTCs) è fondamentale per la prognosi e la diagnosi, per la personalizzazione della terapia antitumorale, per la valutazione della sensibilità del tumore ai farmaci somministrati. Un’identificazione altamente sensibile e specifica potrebbe essere inoltre utile per la diagnosi precoce [42]. Al fine di comprendere i limiti e l’impatto potenziale di questo nuovo settore dell’oncologia è importante considerare:

- i meccanismi che regolano lo sviluppo delle metastasi.
- gli elementi tecnici che determinano la specificità e la sensibilità dell’individuazione delle CTCs.

L’acquisizione della capacità invasiva delle cellule trasformate e la conseguente formazione di metastasi conduce al 90 % delle morti di malati di cancro [43].

Sebbene la metastasi sia l’evento che principalmente conduce alla morte per cancro, il suo meccanismo è ancora poco conosciuto [44]. Il processo che conduce alla tumorigenesi e alla metastasi implica il coinvolgimento del microambiente tumorale secondo i seguenti passaggi: crescita delle cellule tumorali, angiogenesi, distacco delle cellule tumorali, transizione epitelio-mesenchimale (EMT), motilità, ingresso nei vasi, successiva fuoriuscita dai vasi, transizione mesenchima-epitelio (MET), formazione di micrometastasi ed infine trasformazione in metastasi [45].

Quando si è costituito un letto vascolare, tramite angiogenesi, le cellule tumorali possono aver acquisito sufficienti mutazioni genetiche da essere in grado di staccarsi dall'epitelio ed invadere i vasi sanguigni. EMT è un cambiamento fenotipico che caratterizza l'invasione del carcinoma e la metastasi. Le cellule epiteliali, col loro ruolo strutturale e funzionale negli organi, sono a mutuo contatto tra loro e aderenti alla matrice extracellulare (ECM) tramite giunzioni. Le cellule tumorali simil-mesenchimali mostrano un fenotipo altamente mobile e possono facilmente entrare ed uscire dai vasi attraversando le membrane basali, gli spazi interstiziali e le barriere endoteliali [46]. Al raggiungimento dell'organo bersaglio è necessario che le cellule tumorali circolanti simil-mesenchimali ritornino cellule tumorali simil-epiteliali mediante una transizione mesenchimale-epiteliale (MET) per riacquisire la capacità proliferativa [47].

Mentre le teorie convenzionali assumono che l'invasione e la metastasi siano eventi tardivi, attualmente si ritiene che l'invasione avvenga precocemente e sia clinicamente silente. Per quanto concerne i pazienti con cancro del colon, una percentuale del 20-30 % presenta macrometastasi alla diagnosi confermando l'ipotesi che alcuni tumori possano diffondere le cellule tumorali in stadi precoci del loro sviluppo. La formazione di metastasi è un processo molto inefficiente, rispetto al milione di cellule per grammo di tessuto tumorale che sono introdotte giornalmente nel flusso sanguigno. Le cellule epiteliali tumorali in circolo hanno possibilità molto basse di sopravvivenza. Il destino delle CTCs comprende una loro rapida scomparsa in meno di 5 minuti e riguarda l'85% delle cellule circolanti. In studi su animali le cellule tumorali vengono inoculate direttamente nella circolazione sistemica e circa 1/40 delle CTCs produce micrometastasi e soltanto, approssimativamente, lo 0,01 % di queste produce macrometastasi [48].

L'inefficienza metastatica è determinata da:

- suscettibilità delle CTCs all'apoptosi

-fallimento delle singole cellule esterne ai vasi nel dare inizio alla crescita in organi distanti

-fallimento di micrometastasi precoci in organi distanti a stimolare l'angiogenesi e la crescita di tumori macroscopici [49].

E' fondamentale tener conto dei dati più recenti riguardo i meccanismi coinvolti nel processo di metastasi e riconsiderare l'implicazione delle CTCs in base alle nuove conoscenze. Ci si attende che antigeni epiteliali siano sotto-espressi nelle CTCs più invasive a causa del processo di transizione epitelio-mesenchima. Antigeni mesenchimali possono essere espressi nelle cellule invasive così come nelle cellule mesenchimali non tumorali, quali leucociti, molto più numerosi delle CTCs nel sangue [50]. L'aumentata capacità di caratterizzare CTCs in termini di mutazioni geniche e profili di espressione ne integrerà l'individuazione ed il computo, migliorando il processo di identificazione non-invasiva in pazienti ad elevato rischio di recidiva e metastasi. L'identificazione e la quantificazione delle CTCs quando sono molto rare (poche CTCs per 10 ml di sangue, che significa poche CTCs mescolate con circa 100 milioni di leucociti e 50 bilioni di eritrociti) potrebbe allertare l'oncologo circa lo sviluppo del tumore nel processo invasivo [51]. Pure la specificità è un requisito fondamentale in questo campo. Infatti un'errata identificazione di "cellule non tumorali" potrebbe generare scelte clinico-terapeutiche con un impatto negativo sulla qualità e/o l'aspettativa di vita in pazienti con cancro. I metodi basati su RT-PCR analizzano l'espressione di geni candidati specifici per le cellule epiteliali e/o per i tessuti normali dai quali originano le cellule tumorali. Il principale vantaggio di tale approccio è la sua sensibilità considerata più alta di quella riportata nei saggi immuno-mediati o immunocitochimici [52].

I metodi di PCR possono identificare una cellula bersaglio tra 10^6 - 10^7 cellule normali che corrisponde a circa 0,1-1 ml di sangue. Un importante limite dell'RT-PCR è

che le CTCs vengono demolite con tale tecnica, rendendo impossibile contarle o analizzarle individualmente [53].

MicroRNA

Una nuova classe di piccoli RNA (microRNA) risulta oggi promettente nella ricerca di marcatori di CTC nel sangue dei pazienti [55]. I microRNA (miRNA) rappresentano una classe di piccoli RNA di circa 22 nt di lunghezza, non codificanti e da un punto di vista evolutivo altamente conservati, che regolano l'espressione dell'mRNA bersaglio con un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale realizzato mediante appaiamento incompleto [56-57].

Recenti studi hanno dimostrato che l'aberrante espressione di miRNA è comune a molte patologie umane tra cui invecchiamento, problemi cardiovascolari, cancro e malattie autoimmuni [58]. I miRNA giocano un ruolo chiave in processi di crescita cellulare, differenziamento, proliferazione e apoptosi e polarizzazione neuronale. Fino al 30% di tutti i geni umani sono probabilmente regolati da miRNA.

miRNA biogenesi e meccanismo d'azione

Nel 1990, Ambros e i suoi colleghi hanno scoperto un prototipo di gene miRNA lin-4 e let-7 in *Caenorhabditis Elegans*. Poichè la funzione dei miRNA non era ancora stata chiarita, queste piccole molecole di RNA erano inizialmente considerate "junk RNA", RNA spazzatura. Da allora lo studio dei miRNA è esploso e nel 2006, Andrei Z. Fire e Craig Mello hanno vinto il Premio Nobel nella medicina per il loro lavoro svolto per la comprensione della regolazione l'espressione genica dei miRNA. Un gran numero di studi ha rivelato l'enorme conoscenza sulla biogenesi e il meccanismo d'azione dei

miRNA [59]. Paragonati all'espressione di geni regolatori precedentemente trovati, i miRNA sono differenti e nella produzione e nella biosintesi.

Il processo di biosintesi è complesso. Il miRNA genico è codificato da un lungo trascritto primario miRNA, processato in un precursore miRNA (pre-miRNA) da una RNA polimerasi II. Questo tipo di trascritto primario ha un cap al 5' e una coda di poly-A al 3'. Due differenti tipi di RNasi III, DROSHA e DICER, completano la conversione e la modifica dei miRNA, rispettivamente nel nucleo e nel citoplasma.

I pre-miRNA sono esportati nel citosol dalla esportina 5, una proteina nucleare RAS-GTP associata. Nel citosol, il pre-miRNA è tagliato da DICER in un doppio filamento di 22 nucleotidi. Un filamento "passeggero" viene degradato mentre l'altro filamento "guida" entra in RISC (complesso di induzione del silenziamento di RNA). RISC si indirizza al 3' non tradotto di uno specifico mRNA, destabilizzando l'mRNA bersaglio e reprimendone la traduzione (Fig. 7).

L'appaiamento interessa di solito pochi nucleotidi, da 2 a 8, del microRNA maturo e questa regione è chiamata "seed" [60]. Le sequenze di microRNA mature sono localizzate negli introni o negli esoni di pri-miRNAs, nella regione organizzata in una struttura a forcina. Inoltre alcuni miRNA sono localizzati all'interno di esoni di geni codificanti proteine [61].

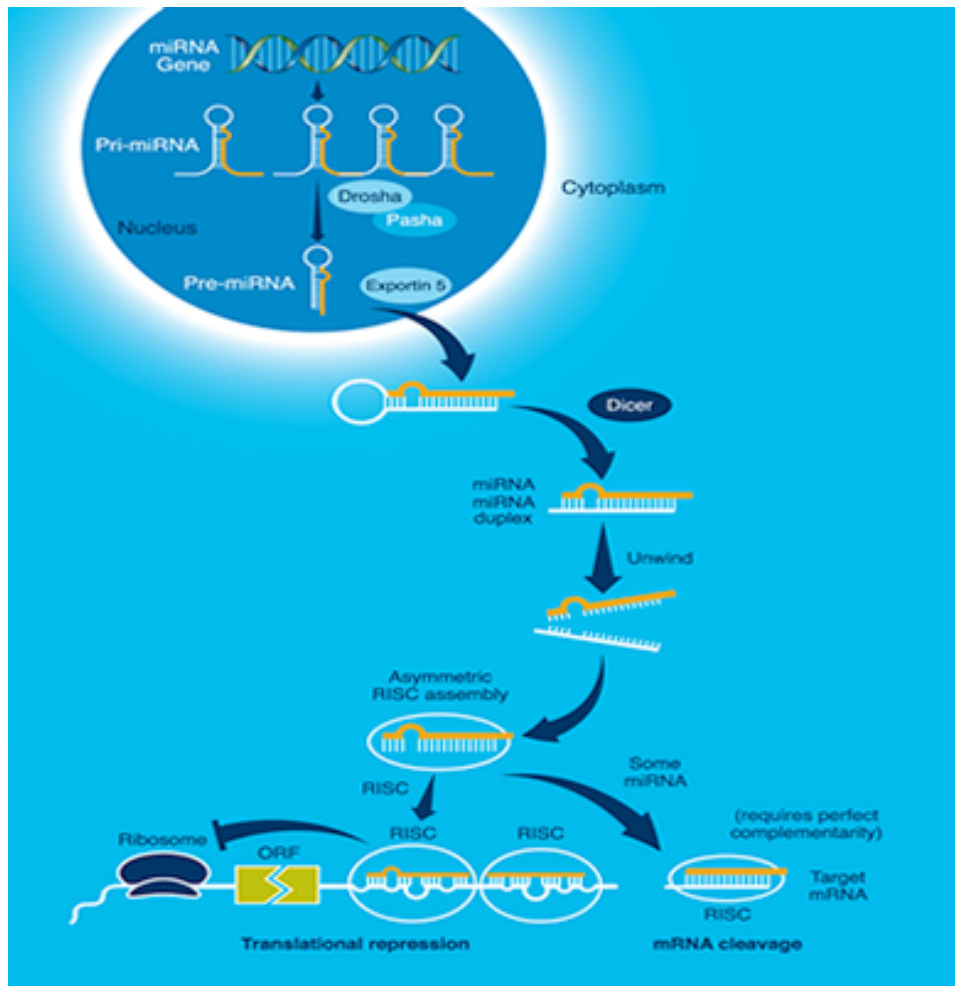


Figura 7: Biogenesi dei microRNA

Fonte <http://www.openbiosystems.com/RNAi/miR-expressLentiviralmicroRNA/>

miRNA oncogeni e oncosoppressori

I miRNA possono funzionare sia da oncogeni che da oncosoppressori, a seconda del loro bersaglio nel tessuto specifico. Infatti, un microRNA può agire da soppressore tumorale se il bersaglio è un oncogene, può agire da oncogene (oncoMIR) se il bersaglio è un oncosoppressore. Una delle prime famiglie oncogeniche individuata è stata miR-17, 92, amplificato nei linfomi e nei tumori solidi [61-62]. Questi miRNA promuovono la proliferazione in linee cellulari, accelerano l'angiogenesi e la tumorigenesi nei modelli murini. Nel 2005 Michell e colleghi hanno dimostrato che questa famiglia genica è

attivamente trascritta da C-Myc che attiva anche E2F, fattore di elongazione trascrizionale 2, e il suo repressore miR-17-92, consentendo così uno stretto controllo proliferativo [63].

Alcuni microRNA che sono deregolati nella leucemia linfocitica cronica presentano mutazioni nella linea germinale o somatica, a carico dei loro precursori, che hanno effetti sul processamento delle molecole di microRNA mature a singolo filamento [64].

La sovra-regolazione dei microRNA può essere dovuta ad amplificazione, deregolazione di un fattore di trascrizione, o demetilazione di un'isola CpG nelle regioni dei promotori.

Membri della famiglia di *let-7*, che sono deleti o repressi nel cancro al polmone, hanno come bersaglio RAS; di conseguenza la perdita di *let-7* comporta una sovra-espressione di RAS [65]. Inoltre miR-15 e miR-16, che vengono deleti o de-regolati nella leucemia linfocitica cronica, causano una sovraespressione di BCL2, che protegge le cellule dall'apoptosi [66]. L'espressione di un set di 21 microRNA risulta poi alterata in almeno tre differenti tipi di tumori solidi. Uno di questi è miR-21, che è di particolare interesse perché capace di legare e silenziare l'oncosoppressore PTEN. PTEN codifica per una fosfatasi coinvolta nella via del fosfatidilinositolo 3 chinasi, che risulta deleta o mutata nel cancro alla mammella, al polmone, alla prostata [67]

MicroRNA biomarcatori

Un fattore sicuramente rilevante nella biologia dei microRNA è la loro rimarcata stabilità. Per esempio i miRNA sono perfettamente conservati sia nei campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina e possono essere facilmente estratti e valutati. [69]. Perciò, possiamo affermare che la stabilità di questi piccoli frammenti nucleotidici, potrebbe consentire lo sviluppo di praticabili metodi di rilevazione, avendo a disposizione delle condizioni di conservazione ideali.

Anche se il numero totale di microRNA rimane controverso e il ruolo di specifici microRNA è solo preliminarmente stato definito, analisi di espressione di microRNA indicano che differenti tumori mostrano un profilo di espressione specifico, significativamente differente rispetto al tessuto normale. Inoltre stanno definendosi quali biomarcatori altamente tessuto specifici, rendendo possibile un'applicazione clinica nel definire l'origine del cancro già nelle metastasi [69-72].

Ulteriori dati ci riportano che l'abbondanza nei fluidi corporei può riflettere condizioni fisiologiche o patologiche e inoltre, può dare informazioni molto più accurate della quantità degli mRNA. Semplicemente perché gli mRNA devono essere tradotti in proteina per avere un effetto biologico, invece i miRNA hanno già essi stessi parte attiva, spesso influenzando l'espressione di molti altri geni, e questo li lega più direttamente alla fisiologia cellulare alterata.

Il primo miRNA utilizzato come biomarcatore nel siero è stato miR-21. Lawrie e colleghi hanno associato la sua espressione ad una prognosi sfavorevole nei pazienti con linfoma a cellule B. In seguito il gruppo di Mitchell ha identificato miR-141 molto espresso nel siero di pazienti con cancro alla prostata, i livelli di miR-141 potevano identificare il cancro alla prostata con alta sensibilità e specificità [71]. Sicuramente saranno necessari ulteriori test su popolazioni più estese affinché questi marcatori si possano utilizzare nella pratica clinica. Questi studi preliminari indicano nell'individuazione di microRNA nel sangue un'area promettente per l'identificazione di marcatori del cancro [72].

Microarray

Il profilo d'espressione genica di una cellula ne determina fenotipo, funzioni e risposta a stimoli esterni. Per questo motivo la sua analisi permette di indagare i meccanismi di regolazione e le vie metaboliche cellulari. In particolare l'analisi dell'espressione genica di un tessuto patologico comparato con un tessuto normale permette la comprensione della patologia e l'identificazione di potenziali marcatori per un intervento terapeutico.

Tale affermazione trova speciale applicazione nel caso dei tumori, nei quali le diverse tappe di insorgenza e progressione neoplastica sono determinate dalla sommatoria di mutazioni a carico di centinaia di geni la cui espressione risulta alterata. I metodi di biologia molecolare tradizionali consentono lo studio di uno o pochi geni alla volta impedendo una visione d'insieme dell'evento biologico, come invece sarebbe utile nel caso di malattie complesse come i tumori.

I microarray sono diventati un potente mezzo d'indagine, il cui potere risiede nella capacità di studiare i livelli di espressione di migliaia di geni o di tutti i geni di un intero genoma in un singolo esperimento. La tecnologia cDNA microarray trae spunto dalla tecnica Southern blot che utilizza membrane di nylon come filtri per rivelare, tramite autoradiografia, dei frammenti di DNA (derivati da digestione enzimatica) ibridati con specifiche sonde di DNA marcato radioattivamente.

Inizialmente le membrane di nylon venivano sostituite con supporti solidi non porosi, come il vetro, che hanno permesso la miniaturizzazione e la conseguente rilevazione di un numero sempre maggiore di geni. Inoltre l'utilizzo di sostanze coloranti,

come le cianine, hanno consentito un rilevamento basato sulla fluorescenza, sostituendosi alle sostanze radioattive sicuramente più pericolose e impegnative da maneggiare.

Esistono sostanzialmente due tipi di tecnologie microarray.

La prima, che si basa sull'uso di oligonucleotidi direttamente sintetizzati sulla superficie di un vetrino oppure depositati, sempre sulla superficie del vetrino, sotto forma di soluzioni, è commercialmente disponibile col nome di GeneChip, messa a punto dalla Affymetrix di Santa Clara (California). Questo array, ad alta densità di oligonucleotidi (circa 100.000 in un chip), è sintetizzato in situ mediante tecniche fotolitografiche (la fotolitografia è un procedimento di riproduzione fotomeccanica attraverso cui si ottiene una pellicola utilizzabile per la preparazione di una lastra di stampa).

L'applicazione principale di questa tecnologia è quella di scoprire polimorfismi e mutazioni, rendendola particolarmente adatta per studi epidemiologici, anche se presenta alcuni inconvenienti, come l'alto costo e la necessità di conoscere a priori le sequenze dei geni che devono essere incluse nel set di oligonucleotidi assemblati.

La seconda tecnologia, detta cDNA microarray, crea degli spot di frammenti di cDNA (DNA complementare che è sostanzialmente un mRNA retrascritto artificialmente in DNA ma privo delle regioni non codificanti, o introni, che si ritrovano nel DNA genomico di partenza), amplificati con la tecnica PCR, depositandoli su un vetrino o una membrana di nylon, utilizzando un'apparecchio robotizzato. La tecnica ha un'elevata flessibilità, in quanto consente la produzione propria di microarray contenenti cloni di interesse e inoltre, per fabbricare e utilizzare questa tecnologia non sono richieste informazioni sulle sequenze di DNA, infatti, la maggior parte dei geni umani, la cui espressione è stata studiata usando DNA microarray, è attualmente definita solo attraverso parziali sequenze EST ("Expressed Sequence Tag").

La progressione della tecnologia DNA microarray, impiegata da pochi anni, è inevitabile, dal momento che i vantaggi che possono derivare dal suo utilizzo nella ricerca scientifica sono chiari ed evidenti. Infatti, può consentire diverse applicazioni come la scoperta di nuove funzioni geniche, lo sviluppo di farmaci grazie all'identificazione di nuovi bersagli molecolari, la diagnosi e prognosi di una malattia, la valutazione della tossicità di sostanze in campo farmaceutico, alimentare e ambientale [73].

Capitolo 2

Scopo della Ricerca

Nell'intero corso di dottorato, la nostra ricerca si è proposta di individuare, con 3 differenti approcci, RNA potenziali marcatori molecolari della presenza in circolo di cellule tumorali circolanti (CTC) in pazienti con cancro del colon.

In prospettiva questi marcatori potrebbero essere utili per la realizzazione di test clinici di diagnosi, basati sulla RT-PCR e qRT-PCR.

La letteratura, come già ampiamente descritto nell'introduzione, presenta numerosi approcci per identificare le cellule tumorali circolanti. Nessuno di questi, a tutt'ora, si è dimostrato completamente utile e valido, spesso per la scarsa sensibilità dei metodi proposti e della bassa specificità. Uno dei metodi più accreditati prevede l'utilizzo di anticorpi che riconoscono marcatori di membrana epiteliali, che se da una parte ha le caratteristiche di essere molto specifico, è però scarsamente applicabile a causa della bassa sensibilità. Il sistema di screening deve infatti individuare pochissime cellule tumorali, almeno nei primissimi stadi della malattia, diluite nel flusso sanguigno. In secondo luogo rischia di non rilevare tutti i potenziali marcatori il cui prodotto non è una proteina.

La PCR ha sicuramente il vantaggio di superare i problemi di mancanza di sensibilità e specificità connessa con altri metodi di identificazione. La reale difficoltà di questa tecnica è quella di selezionare i "giusti" marcatori.

I Parte

Ricerca di mRNA epitelio specifici.

Identificazione per mezzo di microarray e test di screening basato sulla RT-PCR di mRNA epiteliali nel sangue periferico di pazienti con cancro del colon.

In questa prima parte ci siamo occupati, utilizzando la tecnica del microarray, di identificare degli mRNA epiteliali, espressi dalla mucosa del colon e sotto-espressi nel sangue. I marcatori con queste caratteristiche sono stati ricercati nel sangue periferico sia di pazienti affetti da cancro del colon, sia di controlli sani per mezzo di RT-PCR .

Questa ricerca non ha portato all'identificazione di marcatori validi, pertanto, ci siamo concentrati successivamente, su una classe di RNA bersaglio del recettore epiteliale EGFR.

II - Parte

Ricerca di mRNA bersaglio di EGFR (Recettore del fattore di crescita epidermico)

La seconda parte dello studio si è proposta di identificare geni bersaglio di EGFR. L'EGFR è altamente espresso nel cancro del colon, con valori superiori al 80%. Recenti studi hanno concluso che EGFR è un valido marcatore per tutti i tumori solidi, con alta specificità di rilevazione nel sangue periferico. Tuttavia l'mRNA di questo recettore risulta poco sensibile, e molti soggetti sani risultavano manifestarne la presenza nel sangue.

Per questo motivo, ci siamo proposti di aumentare l'accuratezza del metodo con la selezione di un pannello di candidati marcatori, bersaglio di EGFR, identificati per mezzo di microarray.

A tale scopo abbiamo utilizzato 2 farmaci chemioterapici, il cetuximab e il gefitinib, ampiamente utilizzati in clinica, perché responsabili del blocco selettivo di EGFR, per studiare i geni accesi e spenti da questo recettore. Inoltre abbiamo caratterizzato le linee di adenocarcinoma utilizzate (HT-29 e Caco-2), mediante citofluorimetria, immunoistochimica e microscopia elettronica a scansione.

III – Parte

Ricerca di microRNA marcatori del cancro del colon

Ultimamente la comunità scientifica sta rivolgendo una grande attenzione ai microRNA. Queste piccole molecole, si prestano in effetti ad essere candidati marcatori ideali, sia per l'alta specificità di espressione tessuto associata, sia soprattutto per la rimarcata stabilità. Sono infatti resistenti ai normali processi di degradazione dell'RNA, come già ampiamente descritto nell'Introduzione.

Ci siamo focalizzati nello studiare il processo di trasformazione neoplastica nel primissimo stadio, nella trasformazione cioè da epitelio normale a epitelio iperproliferante, che vede la mutazione dell'oncosoppressore APC associata ad una mancata degradazione di beta-catenina che attiva noti geni proliferativi, c-Myc e ciclina D. Questo passaggio ci sembrava un elemento chiave e nella patogenesi del cancro e nell'identificazione di marcatori nel sangue che distinguessero l'insorgere dell'iperplasia già nei primissimi momenti di trasformazione. In particolare abbiamo voluto indagare sull'esistenza di microRNA regolati in questa via mediante la tecnica dei microarray.

Sfruttando questa volta come modello cellulare una linea di carcinoma coloretale, le HT-29 trasfettate stabilmente con APC, sotto il controllo di un promotore metallo inducibile, cellule gentilmente concesse dal Prof. Bert Volgestein.

Capitolo 3

Materiali e Metodi

Pazienti

Grazie alla collaborazione con il reparto di Chirurgia d'Urgenza (Direttore: Prof. Taffurelli) dell'Ospedale Policlinico Sant'Orsola, sono stati studiati 5 pazienti con carcinoma del colon-retto di stadi differenti (tabella 2).

Da ciascun paziente è stato ottenuto, in prossimità dell'intervento chirurgico, un prelievo di 10-15 mL di sangue periferico venoso, in seguito a consenso informato. Si è avuta cura, all'atto del prelievo, di scartare il primo mL di sangue per ridurre al massimo la contaminazione con cellule epiteliali eventualmente risucchiate durante la perforazione dell'epidermide da parte dell'ago della siringa. Il sangue, raccolto in provetta con EDTA come anticoagulante, è stato trattato entro 1 ora dal momento del prelievo. Con le stesse modalità sono stati ottenuti prelievi di sangue da 6 soggetti normali di controllo.

Tabella 2: Pazienti con cancro del colon e soggetti di controllo.

Pazienti	Età	Sesso	Stadio*	Terapia
1	62	F	T3N1M0	S.R
2	73	F	T4NXM1	B.P
Controlli				
3	83	M		
4	83	M		
5	84	F		
6	79	M		

*Stadiazione secondo l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) e International Union Against Cancer. M, maschio. F, femmina. B.P. by-pass. S.R., resezione del sigma.

Estrazione automatizzata dell'RNA totale

Allo scopo di ottimizzare la riproducibilità delle condizioni sperimentali, l'operazione di estrazione dell'RNA dai campioni di sangue è stata effettuata mediante una nuova metodica, messa a punto nel presente lavoro, che prevede l'impiego di un estrattore automatico di acidi nucleici (ABI Prism 6100).

Questo strumento contiene un sistema di vuoto integrato sottoposto a controllo elettronico ed è costituito da una serie di peculiari caratteristiche costruttive. In combinazione con le soluzioni fornite dal costruttore, è possibile ottenere, mediante eluizione, una purificazione elevata e un alto recupero degli acidi nucleici, in modo riproducibile per ogni esperimento e per ogni pozzetto della piastra di caricamento, che può alloggiare sino a 96 campioni. I lisati cellulari, o i lisati di tessuto omogeneizzato, sono inseriti nei pozzetti della piastra, alla quale viene applicato il vuoto, con la possibilità di specificare sia la durata che l'entità del vuoto da applicarsi. Il vuoto, nella posizione "waste", dirige i detriti cellulari e le soluzioni di lavaggio in un serbatoio esterno, mentre, nella posizione "collection", purifica gli acidi nucleici.

Il campione di sangue viene lisato entro 1 ora dal prelievo, aggiungendo 1 mL di soluzione salina tamponata (PBS) e 2 mL di soluzione di lisi fornita dal fabbricante a ogni mL di sangue. Il lisato è stato conservato a -20°C sino al momento della estrazione dell'RNA totale, eseguita secondo la procedura standard con il kit specifico per lo strumento ABI5700 Applied Biosistem. In ciascun pozzetto venivano caricate in sequenza non più di 4 aliquote da 0,5 mL, per cui il lisato ottenuto da 1 mL di sangue periferico veniva trattato totalmente impiegando due pozzetti. L'RNA totale veniva infine eluito in 120 uL di tampone di eluizione da ciascun pozzetto, ottenendosi, dopo riunione delle aliquote, una sospensione di RNA in 240 uL per ciascun mL di sangue.

E' stata effettuata una precipitazione dell'RNA totale dal tampone di eluizione, mediante aggiunta di Sodio Acetato (0,3 M finale, 24 uL di una soluzione 3M) e 2 volumi di Etanolo puro conservato alla temperatura di -20°C (530 uL), seguita da lavaggio in 530 uL di Etanolo 70%. Il pellet veniva infine risospeso in 20 uL di acqua bidistillata sterile (circa 0,25 ug di RNA/uL) e conservato a -20°C.

L'RNA totale di colon umano è stato ottenuto commercialmente dalla ditta Clontech (Palo Alto, CA). Ipotizzando la presenza di 6×10^6 globuli bianchi /mL di sangue, e una abbondanza di RNA totale dell'ordine di grandezza di almeno 1 pg RNA/globulo bianco, si prevede una quantità teorica di circa 6-12 ug di RNA per mL di sangue. Il recupero dichiarato dal fabbricante è di circa 5 ug per ml di sangue.

Estrazione dell'RNA totale con Trizol–Invitrogen.

Le cellule sono state inizialmente trattate con tripsina (che successivamente è stata inattivata con terreno supplementato di siero) per favorire il distacco dalla fondo del pozzetto di coltura e sono state raccolte in una falcon da 15ml.

Dopo una centrifuga a 400 RCF per 5 minuti e l'eliminazione del surnatante, sono stati aggiunti 800µl di TRIzol Reagent (Invitrogen) per pozzetto da 3cm². Il TRIzol che contiene fenolo e guanidina isotiocianato (inibitore dell'RNAsi).

Con la centrifugazione si sono ottenute una fase acquosa e una fase organica separate da un'interfaccia. E' stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA, alla quale è stato aggiunto un volume pari di isopropanolo che determina la precipitazione dell'RNA. Dopo 15 minuti di incubazione in ghiaccio, è seguita una centrifugazione e, eliminato il surnatante, si è lavato il pellet con etanolo 75%.

Successivamente l'RNA è fatto precipitare in isopropanolo. Successivamente, è stato aggiunto cloroformio nella quantità di 1/5 del volume totale, quindi, il tutto è stato agitato con il vortex per miscelare le due fasi e lasciato per 15 minuti in ghiaccio.

Dopo un lavaggio in etanolo 70% il pellet di RNA viene essiccato a temperatura ambiente per circa 15 minuti in modo da far evaporare tutto l'alcool, potente inibitore della retrotrascrizione. Quando il pellet diventa trasparente lo si solubilizza in acqua DEPC a temperatura ambiente per 10 minuti. L'RNA viene conservato a -80 C°

Retrotrascrizione (RT).

Tutte le retrotrascrizioni sono state effettuate secondo metodiche standard [73]. 2 ug di RNA totale sono stati retrotrascritti in un volume finale di 25 uL in presenza di 0.5 mM di ciascun tipo di desossiribonucleotide trifosfato (dNTP), 200 U di trascrittasi inversa (Murine Moloney Leukemia Virus) e relativo tampone di retrotrascrizione 1C (Promega, Madison, WI). Per l'innesco della reazione sono state usate sequenze di poli(T) (oligo dT-15) con concentrazione finale di 5 mM. L'incubazione è stata effettuata a 42°C per 1 ora, di seguito la miscela è stata posta a 95°C per 5 minuti per porre termine alla reazione. Come controllo negativo è stato incluso un campione d'acqua in tutte le retrotrascrizioni.

Retrotrascrizione (RT) per microRNA

Per i microRNA la retrotrascrizione applicata è stata la stessa descritta in precedenza, con alcune variazioni. Ogni microRNA veniva retrotrascritto a partire da un primer RT-Loop (tab.3) , una sequenza di circa 50 basi capace di formare una struttura a forcina e con 8 basi circa di complementarietà con il miRna maturo [74]. L'incubazione è

stata effettuata a 15° per 20 min, 25° per 10 min e 42° per 40 min e 75° per 10 min.

Terminata la reazione i cDNA venivano conservati a -20°.

RT-Loop	Sequenza 5' 3'
miR200a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATCGT
miR200b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCATCAT
miR-429	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACGGTTT
miR200c	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCCATCA
miR-141	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCATCT
U6	AAAATATGGAACGCTTCACG

Tabella 3: Primer gene specifici utilizzati nella reazione di Retro-Trascrizione.

Progettazione dei primer

La progettazione dei *primer* (tab.4) è stata effettuata secondo i parametri suggeriti da Sharrocks (1994), con l'ausilio del programma Primer 3 e Amplify per elaboratori Macintosh, disponibile liberamente sulla rete Internet e utilizzato in accordo con le istruzioni del programmatore [75]. Di ciascun *primer* è stata successivamente verificata la specificità, con il confronto diretto mediante l'algoritmo BLAST, con le sequenze dei geni, delle EST umane, e dei frammenti genomici contenuti nelle banche dati dell'NCBI. Gli oligonucleotidi così prescelti, sono stati ottenuti da un servizio commerciale di sintesi (Sigma-Genosys, Pampisford Cambridgeshire, UK), come prodotti liofilizzati. La sequenza di ciascun *primer* utilizzato è riportata nella Tabella 1. I prodotti liofilizzati sono stati risospesi in acqua bidistillata sterile alla concentrazione di 100 mM.

I *primer* sono stati utilizzati nei diversi esperimenti sempre alla concentrazione finale di 10 uM.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Gli esperimenti di PCR sono stati effettuati in un volume finale di 25 uL: 10 uL della miscela di retrotrascrizione, in cui erano presenti i cDNA; 0,5 mM di ciascun primer della coppia specifica per amplificare ciascun gene; 1 U di Taq Polimerasi (TaKaRa, Shiga, Giappone) con i reagenti inclusi (1mM di dNTPmix, 1,5 mM MgCl₂, PCR buffer); acqua bidistillata sterile a volume finale.

La miscela è stata sottoposta a 40 cicli di amplificazione, utilizzando il termostato ciclico PTC-200 (*Peltier Thermal Cycler*) della MJ Research (Waltham, MA, USA). Ogni ciclo di PCR comprendeva: denaturazione a 94°C per 30 secondi, appaiamento alla temperatura di *annealing* più bassa fra quelle dei due *primer* (generalmente non inferiore ai 61°C) per 45 secondi, ed estensione a 72°C per 1 minuto. I cicli sono stati preceduti da un'incubazione a 94°C per 2 minuti (denaturazione iniziale) e seguiti da un'incubazione a 72°C per 7 minuti (estensione finale dei prodotti).

E' stato infine prelevato un campione del prodotto di amplificazione di 10 uL, che è stato fatto migrare in elettroforesi su gel di agarosio. L'integrità degli acidi nucleici e la riuscita della retrotrascrizione e della PCR sono state confermate determinando la presenza di un gene espresso ubiquitariamente, la β -2 microglobulina, tramite l'utilizzo di primers appositi (Tab. 4). Un controllo negativo con acqua è stato sempre incluso nelle reazioni di amplificazione. Per l'elettroforesi di controllo dell'amplificazione, è stato utilizzato un gel di agarosio SEAKEM (FMC) all'1,5%, in tampone Tris-Borato-ETDA (TBE) ed etidio bromuro 0,5 mg/mL .

Per essere sicuri che le bande osservate nel gel fossero quelle attese, si sono aggiunti alla corsa elettroforetica i marcatori MBI5 e Gene Ruler. Dopo la corsa, i gel sono stati fotografati con una fotocamera IBI QSP.

Primer	sequenza (5'→3')
<i>PRSS22</i>	CTATCATCGACTGGAAGTC GATATGTGGGCAGGGTTACA
<i>RANBP3</i>	GCTCGTACGAGTGTAGACACTGGGC AGGGACCTCGACAGAGCTGTGCCT
<i>TMEM69</i>	GATGTCTCTCCAGCAAACTTTTC CTGGCTCCATAAGCCATCTGAG
<i>B2M</i>	GCGGGCATTCTGAAGCTGAC TACATCAAACATGGAGACAGCAC

Tabella 4. Primer utilizzati nelle reazioni di PCR.[GenBank:AB021288 (*B2M*), AB010779 (*PRSS22*), NM_003624 (*RANBP3*), NM_016486 (*TMEM69*)]. *B2M*, b-2 microglobulin.

Real Time qPCR

Tutte le reazioni di Real Time PCR sono state realizzate su piastre ottiche da 96 pozzetti, (EU – Extreme Uniform –96 x 0,2 ml) e sigillate con il film ottico adesivo (Opti-seal, Adhesive , EU – Extreme Uniform). Abbiamo utilizzato il Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) della Fermentas. Tutte le reazioni venivano realizzate in un volume finale di 20 ul. I parametri di reazione erano 95° per 10 minuti, denaturazione 95° 30', annealing 46° 20', estensione 72° per 30' per 5 cicli, in seguito la temperatura di annealing veniva aumentata a 51° per altri 35 cicli. I primers utilizzati sono raccolti in tabella 5.

Per i parametri della curva di melting abbiamo impostato una temperatura di partenza di 50°.Termociclatore 7100 thermocycler (Applied Biosystems).

I cicli soglia ottenuti in seguito all'impostazione manuale del threshold, sono stati elaborati con excel. Per l'analisi dei dati abbiamo utilizzato il $2^{-\Delta\Delta CT}$, la variazione cioè del gene relativamente al controllo interno U6 e al tempo 0 di tutte le induzioni come indicato in XX. L'errore veniva valutato come deviazione standar dalla media dei replicati.

Primer	Sequenza direzione 5' → 3'
Reverse Universale	TGCAGGGTCCGAGGTAT
Fw hsa-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGA
Fw hsa-miR-200b	TAATACTGCCTGGTAATGAT
Fw hsa-miR-429	TAATACTGTCTGGTAAAACC
Fw hsa-miR-200C	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA
Fw hsa-miR-141	TAACACTGTCTGGTAAAGATGG

Tabella 5. Primer utilizzati per la la PCR dei microRNA

DNA microarray

Comparazione dell'espressione genica dell'RNA da sangue e da colon usando microArray MWG Pan Human 40K array A, un array basato su vetrini che contengono 20,000 sonde gene-specifico (50 mer) (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany).

In seguito a retro trascrizione e marcatura del cDNA, il cDNA di Riferimento e Investigato venivano marcati con differenti fluorofori e in seguito co-ibridizzati su vetrini contenenti le sonde. I vetrini venivano poi scansionati con un sistema di laser, che restituisce 2 pseudo-colori, per ogni ibridazione. 10 ug di RNA totale sono stati usati per ogni campione. Il cDNA era sintetizzato usando a CyScribe Post-Labeling Kit Cat. no RPN5660

(Amersham Biosciences, Europe, Freiburg, Germany) che fornisce reagenti per la preparazione della marcatura con Cy3 and Cy5. Il primo step prevedeva una incorporazione di aminoallyl-dUTP (AA -dUTP) durante la sintesi di cDNA, l'idrolisi di RNA e purificazione del cDNA purificato, mentre il second step prevedeva una marcatura chimica del cDNA modificato usando un il CyDye NHS-esters e in seguito si provvedeva alla purificazione con colonnine autoseq G-50 (CyScribe GFX Purification kit Cat no.27-9606-02, Amersham Biosciences, Europe, Freiburg, Germany).

Si aggiungevano rispettivamente 130 μ L di buffer preriscaldato al Cy3- e Cy5-fluorofori marcati, e si procedeva all' ibridazione per mezzo di microarray "Gene Frame", un sottile film che impedisce l'evaporazione di reagenti durante l'incubazione a 37°C overnight.

I lavaggi venivano fatti per 3 volte e 10 minuti con 1 x saline sodium citrate (SSC), 0.1% sodium dodecil solfato (SDS) a 42 °C, e 3 volte per 5 min con 0.1 x SSC a temperatura ambiente . I vetrini venivano asciugati per centrifugazione per 2 min a 2000 rpm.

Acquisizione immagine dagli array

La scansione dei vetrini ibridati avveniva con un GenePix 4000a DNA microarray scanner (Axon, Union City, CA, USA). La potenza del laser per i colori rosso e verde era aggiustata allo scopo di ottenere una intensità del rapporto globale vicina a 1. Ogni spot era definito usando una griglia fornita dal produttore, con un aggiustamento manuale per il posizionamento sul blocco. Gli spot che non mostravano segnale o mostravano difetti di ibridazione erano esclusi dall'analisi. I dati sono stati ricavati con il software GenePix Pro3.0 (Axon Instruments). Per ogni canale veniva calcolata la mediana dell'intensità dei pixel per ogni spot e per la corrispondente area intorno (background).

L'intensità dei singoli spot era calcolata come differenza del segnale mediana dell'intensità e intensità dei pixel dell'area circostante corrispondente.

I dati così ottenuti venivano normalizzati secondo la TI (intensità totale) del singolo canale, sul singolo vetrino, e caricati su un programma di gestione dati (File Maker Pro 7 per macintosh).

MicroRNA microarray

Una libreria di 515 oligonucleotidi di microRNA, come triplicato di sonde concatenate (antisense) specifiche per miRNA umani e murini sono state depositate su membrane GeneScreen Plus (NEN). 2 ug di RNA-array di controllo sono stati aggiunti ai 30 ug di RNA del campione da analizzare. 10 ug di RNA totale estratto con trizol, veniva arricchito della componente a basso peso molecolare con Microcon YM-100 columns (Millipore).

L'RNA raccolto veniva marcato terminalmente con [γ -³²P]ATP usando il kit max kinase (Ambion). I radionucleotidi non incorporati venivano rimossi con colonnine G-25 (Amersham) L'RNA così ottenuto veniva ibridato su membrane microArray per tutta la notte a 42° con UltraHyb-Oligo buffer (Ambion). Le membrane venivano lavate 2 volte per 30 min con SSC, 0.1% SDS e 1 volta con 0.2×SSC, 0.1% SDS ed esposte su storage phosphor screens e lette allo Storm 860 Phosphorimager. Per assicurare l'accuratezza dell'ibridazione il campione marcato veniva ibridato su 3 differenti membrane.

Analisi dei dati

Tutte le analisi statistiche sui dati di microarray che sono state eseguite facendo uso del software Rv2.5.0 [<http://www.r-project.org/>] e del pacchetto di programmi di Bioconductor [<http://www.bioconductor.org/biocLite.R>] rispondevano a queste condizioni. In primo luogo i dati sono stati corretti dal background sfruttando un “normal plus exponential convolution model”. E’ stata applicata una prima normalizzazione sul singolo vetrino che normalizza i valori di M- (logaritmo dei rapporti) per ogni singolo microarray facendo uso di un metodo robusto di misura di regressione per ogni gruppo di spot e un metodo bayesano empirico per restringere le curve degli spot vicini verso un valore comune e successivamente fra gli array facendo uso di un metodo che assicura che valori A (media delle intensità) avessero la stessa distribuzione empirica tra vetrini differenti, lasciando i M-valori (logaritmo dei rapporti) identici [78]. Dopo questa prima normalizzazione, sono stati filtrati gli spot vuoti e i controlli negativi in tutti gli array. Su questi dati si è calcolato un valore soglia di background del logaritmo dell'intensità di 6,2. E sono stati considerati validi ulteriormente per l’analisi solo i 16.443 sulle 20.160 sonde che mostravano un'intensità media $> 6,2$ in almeno un vetrino.

Il Hierarchical agglomerative clustering nelle heatmaps è stato eseguito sulla distanza di correlazione fra i campioni. I dati sono stati analizzati separando canali (rosso-verde); un modello lineare misto è stato applicato una stima della correlazione fra i due canali per lo stesso spot.

Un T-test moderato è stato computato facendo uso di un metodo di Baies empirico per restringere le varianze di campione sonda-saggio verso un valore comune e per aumentare i gradi di libertà per le diverse varianze [75]. Il metodo di Benjamini Hochberg per le prove multiple è stato usato per ottenere un valore di p-val.

Analisi dei pathway: le vie alterate sono state definite secondo l'annotazione di KEGG [76]
Inoltre la mappatura fra le sonde e le vie è stata compiuta con il software R sul database di KEGG,

Per ogni pathway P l'analisi della significatività è stata calcolata considerando la distribuzione ipergeometrica: [78-80]:

$$p = \frac{S!F!N_P!N_{\bar{P}}!}{\alpha!\beta!\gamma!\delta!N!}$$

dove

α = numero di sonde significative $\in P$

b = numero di sonde non significative $\in P$.

g = numero di sonde significative $\notin P$.

d = numero di sonde non significative $\notin P$.

S = numero di sonde significative in the array

F = numero di sonde non significative in the array

N_P = numero di sonde $\in P$

$N_{\bar{P}}$ = numero di sonde $\notin P$

Colture cellulari

Le HT 29 e le Caco-2 e HEK-293 forniti dall'American Type Culture Collection (ATCC) sono state coltivate in terreno Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), con aggiunta di 25 mM glucosio e 2 mM L-glutamine, antibiotici (100 U.mL⁻¹ penicillin and 100 mg.mL⁻¹ streptomycin) e con 10% (v/v) di siero bovino inattivato al calore (Cambrex, Verviers, Belgium). Cellule venivano fatte crescere in incubatore a 37°C e 5% CO₂ e il terreno veniva cambiato ogni 3 giorni. Per tutti gli esperimenti le cellule venivano trattate al 70% di confluenza.

Le HT-29-APC, le HT29-GAL erano coltivate con aggiunta di igromicina 0.5 mg/ml, (Invitrogen) e venivano indotte con ZnCL_2 (Sigma) 100uM.

EGFR-inibitore tirosino chinasi (ZD1839; Iressa; gentilemnte concesso da AstraZeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, United Kingdom), anticorpo monoclonale anti-EGFR cetuximab (IMC-C225; Erbitux; kindly provided by Merck KGaA, Darmstadt, Germany), e Fattore di crescita epidermico (EGF) SIGMA Saint Louis, Missouri, USA. Le concentrazioni raccomandate dalle aziende produttrici erano: 10 nM EGF, 1uM gefitinib.

Saggi di vitalità cellulare

HT-29 and Caco-2 venivano contate usando una soluzione di Trypan Blue al 10 % in una camera di conta Neubauer Brand, (Wertheim, Germany). Le cellule vive (non colorate) e le morte (colorate) venivano contate al microscopio [72]. Le cellule erano seminate in fiasche di 25 cm² (Becton Dickinson Labware Europe Le Pont De Claix, France) alla concentrazione di 4.0×10^5 cellule per fiasca e incubate per 5 giorni. Le cellule venivano lasciate senza siero per 24 h, e in seguito venivano incubate per 24 ore con EGF, gefitinib, cetuximab, EGF and gefitinib, EGF and cetuximab.

Dopo il trattamento con i farmaci le cellule venivano lavate con Phosphate Buffer Saline (PBS 1X e staccate con trispisna 0.1% trypsin-1 mmol/L EDTA in PBS, e contate.

Analisi del ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare era valutata per mezzo di citofluorimetro a flusso. Le cellule HT-29 e Caco-2 erano trattate come già descritto nei saggi di vitalità cellulare. Dopo il distacco venivano lavate 2 volte con PBS e risospese in una soluzione contenente

0.1 % sodium citrate, 0.1 % Nonidet 40, 50 mg/mL propidio ioduro e 10 mg/mL RNAase.

Le cellule erano incubate per 30' a 37°C al buio.

I profili del ciclo cellulare erano determinati usando il Biorad Bryte HS citofluorimetro a flusso (Biorad,UK) e analizzati con Modfit software [73]. Per le condizionate delle cellule trattate e non trattate erano realizzati 4 indipendenti esperimenti e 4 replicati ognuno.

Immunoistochimica

Le cellule HT-29 e Caco-2 sono state seminate in Lab-Tek a 2 camere (Nunc, Naperville IL) alla concentrazione di 8×10^4 cellule per camera e incubate per 5 giorni. Le cellule erano trattate come già descritto nei saggi di vitalità cellulare. In seguito fissate in metanolo per 10 min a -20°. Le cellule venivano poi asciugate per 3-5 min sotto il flusso della cappa e portate a -20°.

L'immunoistochimica sfruttava un metodo non biotina (Novolink, Novocastra Laboratories, Newcastle UK). I vetrini venivano sciolti per 1 min a temperatura ambiente (RT) e immersi in una soluzione allo 0.5% metanolol/H₂O₂ per 10 min per bloccare la perossidasi endogena, lavate 3 volte in acqua distillata e immerse in a PBS pH 7.2-7 per 10 min. Le cellule venivano incubate tutta la notte a temperatura ambiente e in un'atmosfera umidificata utilizzando un anticorpo anti-EGFR(clone 31G7, Zymed Laboratories, CA, USA) diluito 1:120. Cellule erano lavate in PBS e processate usando il Novolink system secondo la procedura suggerita del produttore. La reazione era sviluppata usando un 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 50 mg/100 ml PBS e attivata con perossido di idrogeno per 10 minutes. I nuclei venivano marcati con l'ematossilina di Mayer's, asciugate con xylene e montate con BioMount (Bio-Optica, Milan, Italy). 2 indipendenti

esperimenti con 4 replicati ognuno erano realizzati per le condizioni delle cellule trattate e non trattate.

Valutazione semiquantitativa dell'EGFR

L'EGFR citoplasmatico e di membrana è stato valutato esclusivamente sull'intera popolazione cellulare a 200x secondo un sistema semiquantitativo di EGFR (HistoScore). La percentuale di cellule positive all'EGFR era calcolata con questi valori soglia: $< 1\% = 0$, $> 1\% < 25\% = 1$, $> 25\% < 50\% = 2$, $> 50\% < 75\% = 3$, $> 75\% = 4$. L'intensità della colorazione era indicata come 0 (negativa), 1 (debole), 2 (moderata), 3 (forte). Il prodotto del valore di intensità e della percentuale di marcatura (0-12) ci dava il punteggio finale classificato come segue: $< 1 = \text{Negativo}$, $\geq 1 < 4 = \text{Basso}$, $\geq 4 < 8 = \text{Intermedio}$, $\geq 8 = \text{Alto}$.

Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le HT-29 e le Caco-2 sono state seminate su vetrini Lab-Tek in permanox a 4 camere (Nunc, Naperville IL) alla concentrazione di 4×10^4 cellule per camera e mantenute per 5 giorni come già descritto nei saggi di vitalità. Per ogni esperimento sono state fatte 2 repliche indipendenti per le condizioni non trattate e trattate.

Lo strumento utilizzato era un SEM (Philips SEM 515, Eindhoven, The Netherlands). Tutti i vetrini erano delicatamente lavati con PBS e le cellule fissate con soluzione di Karnovsky (1.5 % glutaraldeide, 1% paraformaldeide, 0.1 M Cacodilate buffer) per 30 min, in seguito lavati con buffer Cacodilate 0.1 M, e fissati per 20 min with Os_2O_4 1% in Cacodilate buffer, deidratati con etanolo e infine asciugati con 2x hexamethyldisilazane (HDMS) per 15 min.

I vetrini sono stati montati su un supporto con film di carbonio bi-adesivo, coperto con un film 20 nm di oro palladio e osservato a 15 kV.

Western blot

Le cellule sono state staccate e raccolte in buffer di lisi (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 e inibitore di proteasi).

Le cellule lisate sono state incubate 1 h in ghiaccio e centrifugate a 12000g per 10 min. Il surnatante è stato trasferito e conservato a -20. La concentrazione delle proteine è stata valutata utilizzando il metodo Lowry. Dopo l'aggiunta di SDS page il sedimento veniva bollito, e 40 ug di proteine denaturate venivano separate su SDS-PAGE 10% e in seguito trasferite su membrane di nitrocellulosa (hybond-amersham). Dopo il trasferimento le membrane venivano incubate con gli specifici anticorpi. Gli anticorpi primari utilizzati erano, anti-APC (C-20 Cell Santa Cruz Biotechnology, USA) and anti-B actin (Sigma, USA); monoclonal anti-myc (myc-9E10 Santa Cruz Biotechnology, USA) diluizioni 1:500. Anticorpo secondario (HRP-conjugated from Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:5000. Immuno marcatura era visualizzata utilizzando ECL (Amersham Biosciences, USA).

Northern blot

40 ug di RNA totale venivano caricati su un gel di poliacrilammide al 15% denaturante con 8M di urea. L'RNA era elettrotrasferito su membrane di nitrocellulosa Hybond N+ (Amersham Biosciences, UK) e ibridizzate usando UltraHyb-Oligo buffer (Ambion). Le sonde complementari al microRNA maturo venivano marcate con il kit T4 kinase (Invitrogen). Le membrane venivano tenute 30 secondi in 150 mJ UV per il cross-link dell'RNA, in seguito asciugate e sottoposte ad una preibridazione a 68° per 3 ore e

inseguito tutta la notte a 42°. Le membrane venivano poi lavate 3 volte per 30 min con 4×SSC, 0.1% SDS at 0.2×SSC, 0.1% SDS ed esposte su storage phosphor screens e lette allo Storm 860 Phosphorimager. Per il controllo sull'RNA totale caricato veniva utilizzato l'RNA U6. Le sonde ibridate sono raccolte nella tabella 6.

microRNA-sonde	sequenza sonde 5' ➔ 3'
hsa-miR-20a	CTACCTGCACTATAAGCACTTTA
Hsa-miR-200A	ACATCGTTACCAGACAGTGTTA
U6	CGTTCCAATTTTAGTATATGTGCTGCCGAAGCGA

Tabella 6: sonde progettate per l'ibridazione in northern blot

Trasfezione

La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta trasfettato, verrà mantenuto nel citoplasma da molte cellule per un determinato periodo di tempo, in genere 2-3 giorni (trasfezione transiente) mentre, solo in pochi casi, verrà integrato nel genoma cellulare (trasfezione stabile). L'isolamento di questi ultimi tipi cellulari e della loro progenie richiede la selezione di un gene marcatore presente nel DNA esogeno, che consente alle cellule trasformate di crescere in un terreno selettivo.

Occorre tener presente alcuni accorgimenti per ottimizzare il processo di trasfezione:

1. DNA trasfettato

Il DNA plasmidico usato negli esperimenti di trasfezione deve essere privo di contaminazioni da proteine, da RNA. Ciò viene indicato da un rapporto A_{260}/A_{280} pari a 1.8-1.9.

Il DNA previamente precipitato con etanolo deve essere risospeso in una soluzione sterile quale TE o MQ autoclavata in modo che la sua concentrazione finale sia circa 0.2-1 mg/ml. La quantità ottimale di DNA trasfettata dipende dal tipo di acido nucleico e dalla linea cellulare d'interesse.

2. Tempo di Trasfezione

Il tempo ottimale di trasfezione è un parametro sempre dipendente dal tipo di DNA e linea cellulare utilizzati, e può variare da 30 minuti a 4 ore.

3. Effetti del siero

E' stato osservato che la trasfezione viene ottimizzata in assenza di siero ed antibiotici nel terreno di coltura.

4. Tipo di vettore

E' bene utilizzare vettori plasmidici che consentono alti livelli di espressione in linee cellulari di mammifero. Essi sono generalmente caratterizzati dalla presenza sia del promotore del Cytomegalovirus (CMV), responsabile dell'espressione costitutiva della sequenza genica inserita nel vettore sia da un gene che conferisce la resistenza all'Ampicillina per la selezione ed il mantenimento del vettore in sistemi batterici come E.Coli.

Ogni plasmide mostra poi caratteri distintivi propri che lo rendono adatto per specifici prodotti sperimentali.

Trasfezione transiente con lipofectamina

Le lipofectamine sono una classe di molecole formate da una coda policationica a cui si lega il DNA e da una porzione lipidica che facilita il passaggio del complesso DNA-lipofectamina attraverso la membrana cellulare.

Tale metodica è molto vantaggiosa per numerose ragioni: il DNA viene rilasciato efficientemente in diversi tipi cellulari, i liposomi sono semplici da utilizzare in quanto non richiedono apparati o accorgimenti particolari, e sono impiegati con successo in studi di trasferimento genico *in vivo*.

Occorre tener presente che, nel caso della trasfezione transiente, durante le 48 ore successive alla trasfezione, i geni esogeni sono soggetti a molte delle attività regolative che controllano l'espressione del materiale cromosomico della cellula. Nel periodo successivo, invece verranno progressivamente persi dalla maggior parte delle cellule per combinazione di fenomeni di degradazione e diluizione, giacché il DNA non integrato, non è solitamente duplicato con il materiale cromosomico della cellula ospite.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

Poiché è stato osservato che la trasfezione viene ottimizzata in assenza di siero ed antibiotici nel terreno di coltura, da 24h prima della trasfezione le cellule sono state coltivate in terreno addizionato del 5% di FBS (invece del 10%) e dell'1% di glutammina (senza antibiotici). Un'elevata efficienza di trasfezione richiede che le cellule raggiungano il 50-80% della confluenza.

Le cellule vengono piastrate in piastre da 6 pozzetti; ogni pozzetto contiene un volume totale di 2ml di terreno supplementato del 5% FBS e dell'1% di glutammina.

Le cellule vengono mantenute in un incubatore termostato a 37°C, umidità relativa controllata e 5% CO₂ per circa 24 ore;

Per ottimizzare l'efficienza del processo di trasfezione è necessario determinare la corretta quantità di DNA, lipofectamina da utilizzare e terreno di coltura, in relazione allo specifico tipo cellulare utilizzato nelle procedure sperimentali.

Il giorno della trasfezione il DNA plasmidico, come la lipofectamina, sono stati opportunamente diluiti in terreno OPTIMEM (casa produttrice) privo di antibiotici e siero e è stata effettuata una incubazione di 15 min a temperatura ambiente.

Successivamente alla soluzione contenente la lipofectamina si aggiunge quella contenente il DNA plasmidico e si lascia in incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti, in modo da favorire la formazione dei complessi Reagente-DNA.

Prima di aggiungere alle cellule il reattivo di trasfezione preparato, i pozzetti in cui sono coltivate le cellule vengono lavati con 2 ml circa di terreno privo di siero ed antibiotici in modo da togliere eventuali residui di siero che potrebbero compromettere o perlomeno ridurre l'efficienza di trasfezione.

Il preparato è poi addizionato alle cellule da trasfettare (alle quali era stato preventivamente tolto il terreno) che vengono poi messe in incubazione a 37°C per circa 4 ore. Trascorso questo periodo viene aggiunto ad ogni pozzetto 2 ml di terreno completo supplementato solo del 5 % di siero e dell'1% di glutammina.

Le cellule vengono quindi poste in incubazione a 37°C per 48 ore.

L'efficienza di trasfezione è stata analizzata mediante microscopia a fluorescenza 24 ore dopo la trasfezione, in quanto il plasmide utilizzato codifica per la green-fluorescent-protein (GFP). La GFP può essere utilizzata come marcatore grazie alla sua capacità di assorbire la luce con un massimo di eccitazione a 395 nm (luce ultravioletta) e riemetterla con un massimo di emissione di 510 nm (luce verde). E' possibile quindi verificare l'efficienza di trasfezione tramite microscopia a fluorescenza.

Il plasmide utilizzato esprimeva la forma mutante di beta catenina. Gentilmente concesso da Wang, Moffitt Cancer Center Research Institute, Tampa, FL, USA.

Capitolo 4

Risultati

I - Parte

Ricerca di mRNA epitelio specifici mediante microarray

Inizialmente abbiamo valutato l'espressione genica tramite l'utilizzo di vetrini microarray MWG che permettono il confronto di due campioni, monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da 20.160 geni.

Per identificare i geni epitelio specifici abbiamo utilizzato tre approcci differenti:

- confronto tra RNA commerciali di leucociti di sangue periferico normale proveniente da 250 individui e mucosa di colon normale e patologica di un unico paziente;
- confronto tra RNA proveniente da un pool di sangue periferico di 4 controlli sani caucasici (tab. 2) ed RNA di adenocarcinoma di colon di 1 paziente
- confronto tra RNA estratto da sangue periferico di 2 pazienti affetti da cancro del colon (tab. 2) ed RNA commerciale di adenocarcinoma.

La scansione dei vetrini è stata effettuata con il software GenePix 3 ed i risultati ottenuti sono stati utilizzati per la successive analisi dei dati.

Per ogni spot è stata valutata la “mediana del background”, misurata come la mediana dell'intensità dei pixel nell'area attorno allo spot, e la “mediana dello spot”, misurata come la mediana dell'intensità dei pixel nell'area all'interno dello spot. L'intensità risultante di ogni spot è stata quindi calcolata come differenza tra la mediana dello spot e quella del background.

I dati così ottenuti sono stati caricati su un programma di gestione dati (FileMaker Pro 7 – per Macintosh), controllati e normalizzati. Abbiamo calcolato il fattore di

normalizzazione sull'intensità totale del segnale dei singoli canali, in modo da bilanciare le differenze del canale rosso e verde su ciascun vetrino.

Per le successive analisi dei dati sono stati scartati:

- gli spot la cui intensità relativa ai campioni di RNA di colon era inferiore a 0;
- gli spot che in seguito a controllo visivo mostravano aree di artefatti;
- gli spot 'vuoti', considerati tali quando la loro intensità non superava il valore del background, o quando il diametro dello spot era inferiore. In quest'ultimo caso, infatti, i livelli di espressione non potevano essere considerati affidabili per motivi tecnici.

Successivamente abbiamo selezionato tutti i geni espressi nel colon e significativamente sotto espressi nel sangue. Per avere numeri significativi, nei rapporti di espressione colon/sangue, abbiamo fatto una trasformazione in modo che tutti i valori relativi al sangue, uguali o inferiori a "0" fossero presi come uguali a "1". Ciò ha permesso ai valori nell' intervallo di rilevazione più basso, per esempio "2" nel colon e "1" nel sangue, di essere misurati come un aumento di almeno 2 volte.

La ricerca di geni che in queste condizioni godevano del più alto rapporto colon/sangue in tutti gli esperimenti, ci ha portato a identificare 10 geni, con un rapporto di almeno 2.8: *PURG* (#AF19551), *TMEM69* (#NM_016486), *RANBP3* (#NM_003624), *PRSS22* (#AB010779), *EED* (#AF080227), *TINAGL1* (#BC009048), *G6PC3* (#BC021574), *SORT1* (#BC023542), *LRRC34* (#BC028610) e *ALDH1B1* (#M63967). Tra questi abbiamo selezionato i 2 geni con il maggior rapporto d'espressione colon/sangue (*RANBP3* e *PRSS22*). Inoltre abbiamo selezionato il gene con il maggiore livello di espressione in valore assoluto, nel colon (*TMEM69*) (Tab 7).

Tabella 7. Sommario delle caratteristiche dei geni individuati.

Simbolo Genico	Descrizione del Gene	Funzione	Sommario
<i>PRSS22</i>	<i>Protease, serine22</i> (Localizzazione: 16p13.3)	endopeptidasi serina-specifica	Membro della famiglia delle tripsine proteasi della serina. Enzima espresso nelle vie aeree regolato durante lo sviluppo. Le proteasi della serina sono coinvolte nella coagulazione del sangue, nel processamento di fattori di crescita, nella digestione delle sostanze nutrienti e nella migrazione delle cellule. L'ibridazione northern blot ha indicato che questo gene è espresso principalmente nel pancreas e debolmente nella prostata e nel cervelletto.
<i>RANBP3</i>	<i>RAN-binding protein-3</i> (Localizzazione: 19p13.3)	GTPasi che lega RAN	La RAN GTPasi svolge un ruolo essenziale nel trasporto delle macromolecole fra il citoplasma ed il nucleo, nella progressione del ciclo cellulare, nell'assemblaggio del fuso mitotico, nell'organizzazione nucleare e della membrana nucleare. RANBP3 (la proteina che lega RAN 3) contiene i motivi di FXFG caratteristici di un sottogruppo di nucleoporine e mostra similarità di sequenza con la regione C-terminale della RANBP1.
<i>TMEM69</i>	<i>Proteina Transmembrana 69</i> (Localizzazione: 17q21.2)	Sconosciuta	-

*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>

Validazione dei candidati marcatori mediante analisi di RT-PCR

I geni *PRSS22*, *RANBP3* e *TMEM69* sono stati analizzati per mezzo di RT-PCR sull'RNA totale estratto dal sangue di 4 campioni sani, RNA commerciale di leucociti di sangue periferico normale proveniente da 250 individui ed RNA di 1 pool di 2 pazienti affetti da cancro del colon-retto.

L'RNA derivante da mucosa normale e neoplastica è stato utilizzato come controllo positivo.

Come visibile in fig. 8 *PRSS22* è stato individuato in 2 dei 5 campioni di RNA di sangue periferico normale, *RANBP3* è stato individuato in 4 su 5 campioni di sangue periferico normale e *TMEM69* è stato individuato in 4 su 4 campioni di sangue periferico normale. Tutti i geni studiati erano espressi sia nella mucosa sana che patologica.

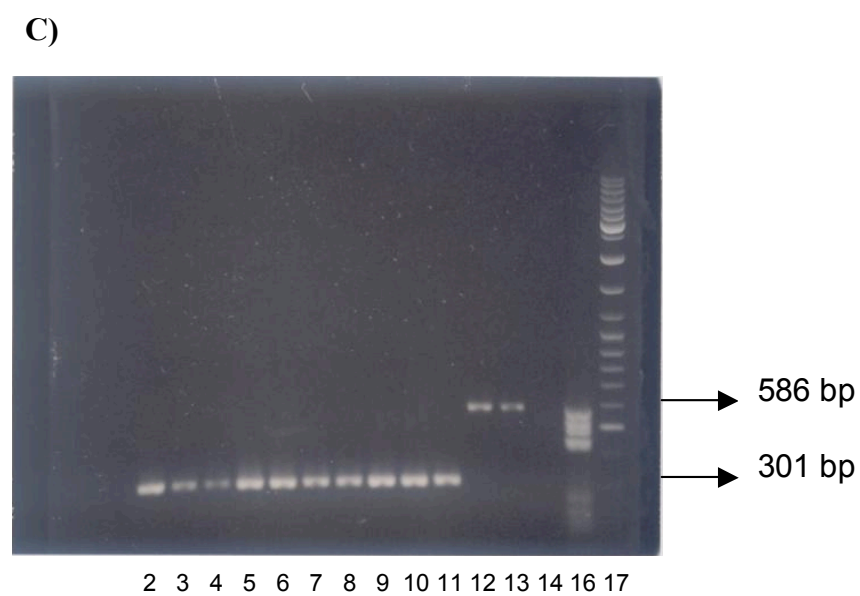
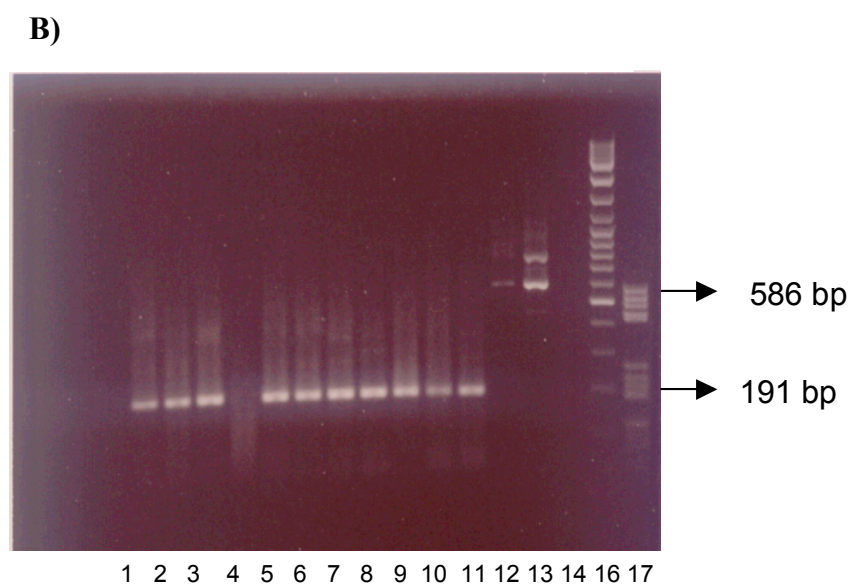
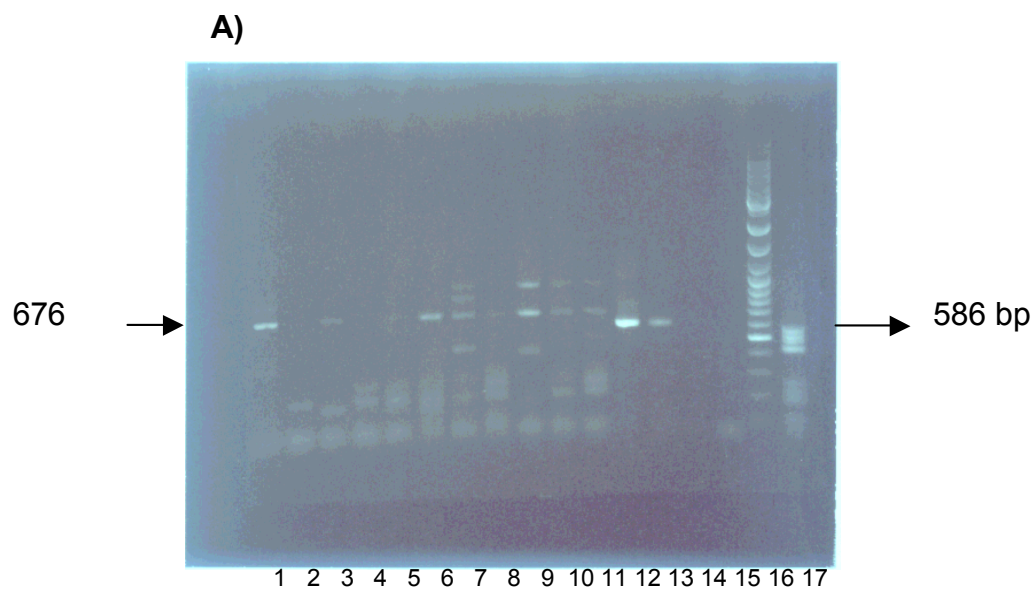


Figura 8. Prodotti di amplificazione da RT-PCR su gel di agarosio 1% colorato con etidio bromuro.

Espressione dei geni A), *PRSS22*, B) *RANBP3* e C) *TMEM69*.

Le corsie per ogni gene sono etichettate con lo schema: corsie 1–4: RNA da sangue di individui normali (Tabella 1 soggetti. 3–6, rispettivamente); corsia 5: RNA di leucociti normali da un gruppo di 250 soggetti (commerciale: BD); corsia 6: sangue di pazienti affetti da cancro del colon (Tabella 1, pazienti no. 1–2); corsia 7: colon normale umano selezionato un soggetto di controllo (commerciale:BD); corsia 8: colon adenocarcinoma isolato da un paziente con cancro del colon (commerciale:BD); corsia 9: mucosa normale da 3 controlli (commerciale: Stratagene); Corsie 10–11: mucosa sana e patologica derivata dallo stesso paziente (commerciale: Stratagene). Controlli tecnici: corsie 12–13: controlli positivi (*B2M*), corsie 14–15: PCR controlli negativi (acqua); corsia 16–17: 1 µL marker MBI V e GeneRuler (Genenco), rispettivamente.

II - Parte

Ricerca di mRNA bersaglio di EGFR (Recettore del fattore di crescita epidermico)

Abbiamo caratterizzato due linee di adenocarcinoma del colon (HT-29 e Caco-2) dal punto di vista della vitalità cellulare, del ciclo cellulare, dell'espressione di EGFR e della morfologia cellulare in relazione alla somministrazione di EGF o alla somministrazione di due repressori dell'EGFR (cetuximab e gefitinib) chemioterapici, ampiamente utilizzati in clinica.

Saggi di vitalità cellulare in seguito all'attivazione/blocco di EGFR

Le cellule HT-29 sono state confrontate con le cellule Caco-2 in rapporto alla crescita cellulare nelle condizioni di controllo e dopo 24 ore dal trattamento con cetuximab e gefitinib. Già dopo 24 ore dal blocco di EGFR, le cellule Caco-2 mostravano una riduzione della vitalità cellulare statisticamente significativa, in tutti i trattamenti rispetto al controllo.

Al contrario le HT-29 non mostravano una variazione nella vitalità cellulare, in nessuna delle condizioni studiate (Fig.9).

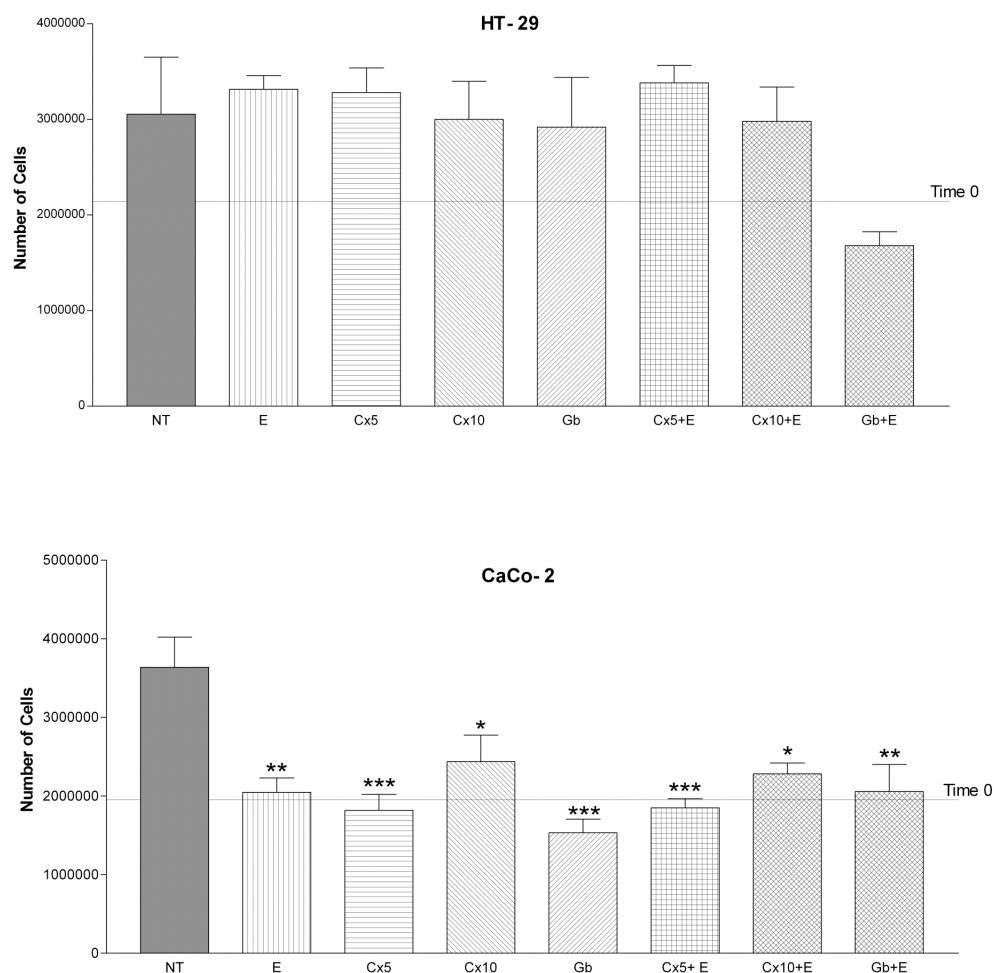


Figura 9. Saggi di vitalità cellulare delle linee HT-29 e Caco-2: Non trattate (NT); 10 nM EGF (E); (Cx5 e Cx10) 5 e 10 nM cetuximab; (Gb) 1 uM gefitinib; 5 o 10 nM cetuximab + 10 nM EGF (Cx5 + E o Cx10 + E); 1 uM gefitinib + 10 nM EGF (Gb + E). ANOVA analisi della varianza a singola via e Tukey Test di comparazione multipla.

CaCo-2. NT vs: **E, ***Cx5, *Cx10, ***Gb, ***Cx5 + E, *Cx10 + E, **Gb + E.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ogni punto rappresenta la media in quadruplicato per ogni campione \pm SD.

Analisi del ciclo cellulare in seguito all'attivazione/blocco di EGFR

Abbiamo effettuato l'analisi al citofluorimetro di cellule HT-29 e Caco-2 per determinare l'influenza dell'attivazione/blocco di EGFR sul ciclo cellulare (Tabella 8).

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i trattati e i non trattati nelle fase G0/G1, ad eccezione della condizione EGF + cetuximab, in entrambe le linee cellulari e per le Caco-2 trattate con EGF.

Riguardo alla fase G2/M è rimarchevole che ci sono differenze di 2 volte per cellule HT-29 e 3 volte per le cellule Caco-2 quando il trattamento con cetuximab + EGF a 5 e 10 nM è confrontato al gefitinib + EGF. In particolare è interessante che per il trattamento con EGF ci sono 2 volte di differenza per le cellule HT-29 e Caco-2. A partire da questi valori ci sono le seguenti differenze rispetto ai controlli: 1.43 volte per le cellule HT-29 e 0.75 per le cellule Caco-2.

Tabella 8: Distribuzione del ciclo cellulare in %.

HT-29	G₀/G₁	S	G₂/M
NT	59,24	27,52	13,24
E	53,82	36,92	9,26
Cx5	56,97	28,55	14,48
Cx10	65,01	27,06	7,93
Gb	55,08	32,88	12,04
Cx5+E	53,24*	30,08	16,68
Cx10+E	48,41	36,03	15,56
Gb+E	54,41	37,89	7,7

CaCo-2	G_0/G_1	S	G_2/M
NT	66,25	20	13,75
E	55,1*	26,69	18,21
Cx5	73,73	15,36	10,91
Cx10	72,50	15,38	12,12
Gb	70,04	18,5	11,46
Cx5+E	57,20	21,13	21,67
Cx10+E	56,01*	24,02	19,97
Gb+E	66,35	26,52	7,13

NT = Non Trattato; E = EGF 10 nM; Cx5 = cetuximab 5 nM; Cx10 = cetuximab 10 nM;
Gb = gefitinib 1 μ M; Cx5 + E = cetuximab 5 nM + EGF 10 nM; Cx10 + E = cetuximab 10 nM +
EGF 10 nM; Gb + E = gefitinib 1 μ M + EGF 10 nM.

ANOVA Analisi della varianza a singola via e Test di Tukey di comparazioni multiple. Ogni punto
rappresenta la media in valori in quadruplicato.

*Statisticamente significativo

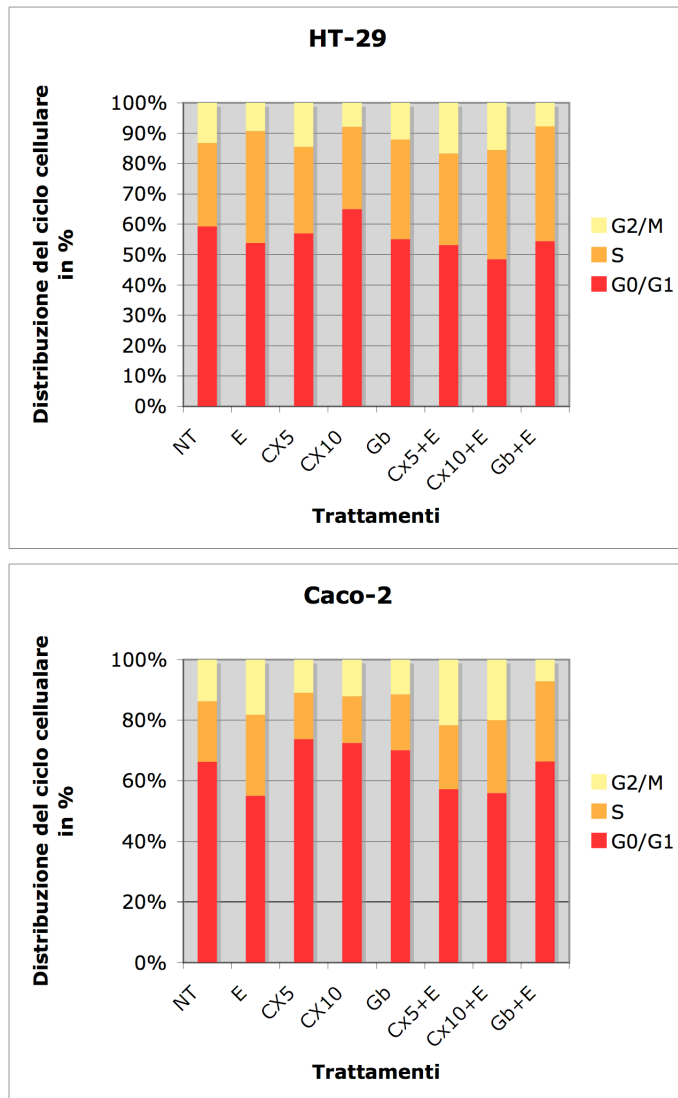


Figura 10: Visualizzazione grafica del ciclo cellulare.

Immunocitochimica in seguito all'attivazione/blocco di EGFR

Abbiamo effettuato l'analisi immunocitochimica di cellule HT-29 e Caco-2 per determinare l'influenza dell'attivazione/blocco di EGFR sui livelli di proteina e sulla localizzazione del recettore. Una valutazione semiquantitativa dell'immunocolorazione dell'EGFR è riassunta nella tabella 9.

Le cellule HT-29 presentavano un più alto livello proteico di EGFR rispetto alle cellule Caco-2 (fig.11 a, b), come si può vedere dall'accentuata colorazione di membrana che contraddistingue le cellule HT-29.

In seguito a trattamento con EGF l'intera colorazione di membrana delle cellule Caco-2 scompare, mentre nelle cellule HT-29 diminuisce, a questo si associa una diffusa e granulare colorazione citoplasmatica nelle cellule HT-29 mentre nelle cellule Caco-2 questa diffusione è molto lieve. Si potrebbe già ipotizzare l'internalizzazione dell'EGFR in entrambe le linee cellulari in seguito a trattamento con EGF (fig. 11 c, d).

Dopo il trattamento con cetuximab 5 nM e 10 nM l'immunocolorazione dell' EGFR di membrana risultava moderato-forte nelle cellule HT-29 e debole per le cellule Caco-2 (fig. 11e, f ; 12i, j). In seguito a combinazione di cetuximab con EGF, si osservava una forte e diffusa colorazione granulare citoplasmatica nelle cellule HT-29 e una debole e focale colorazione granulare citoplasmatica nelle cellule Caco-2 (fig.11 g, h; 12 k, l).

Il gefitinib, da solo mostrava una colorazione dell'EGFR diffusa e forte a livello di membrana in entrambe le linee cellulari (fig.12m, n). Se combinato con la somministrazione di EGF l'immunocolorazione dell'EGFR diventava forte, granulare e citoplasmatica nelle cellule HT-29 e debole e focale nella Caco-2 (fig.12 o, p).

Riassumendo, le cellule Caco-2 presentavano una ridotta espressione di EGFR di membrana rispetto alle cellule HT-29, mentre in entrambe le linee il recettore veniva internalizzato in tutti i trattamenti con EGF, sia da solo che in combinazione con cetuximab o gefitinib.

	HT-29		Caco-2	
	Membrana	Citoplasma	Membrana	Citoplasma
NT	Moderata	<i>Moderata</i>	<i>Debole</i>	<i>Debole</i>
E	Negativa	Moderata	Negativa	Debole
Cx5	Moderata	Moderata	Debole	Debole
Cx5 + E	Negativa	Moderata	Negativa	Debole
Cx10	Moderata	Debole	Negativa	Debole
Cx10 + E	Negativa	Moderata	Negativa	Debole
Gb	Moderata	Moderata	Debole	Debole
Gb + E	Negativa	Moderata	Negativa	Debole

Tabella 9. Valutazione semiquantitativa di EGFR: Membrana = valore di colorazione “Histoscore” di membrana ; Citoplasma = valore di colorazione “Histoscore” citoplasmatico. NT = non trattate; E = fattore di crescita epidermico 10 nM; Cx5= cetuximab 5 nM; Cx5= cetuximab 5 nM + EGF 10 nM; Cx10= cetuximab 10 nM; Gb = gefitinib1 μ M; Gb + E = gefitinib1 μ M + EGF 10 nM.

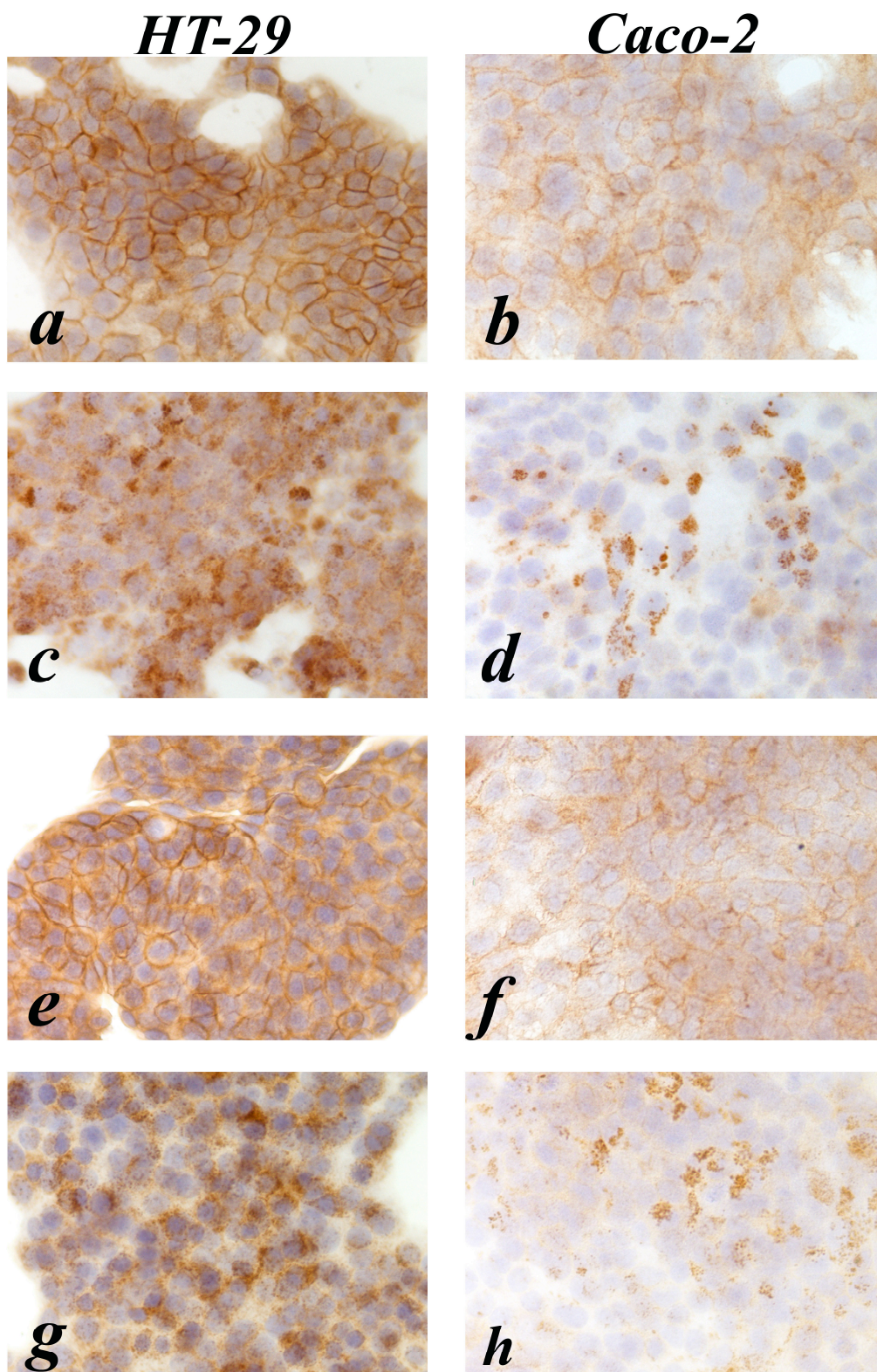


Figura 11.Immunoistochimica su EGFR in HT-29 e Caco-2, rispettivamente;
a, b (non trattate); c, d (trattate EGF); e, f (trattate con cetuximab 5 nM); g, h (trattate con cetuximab 5 nM + EGF).

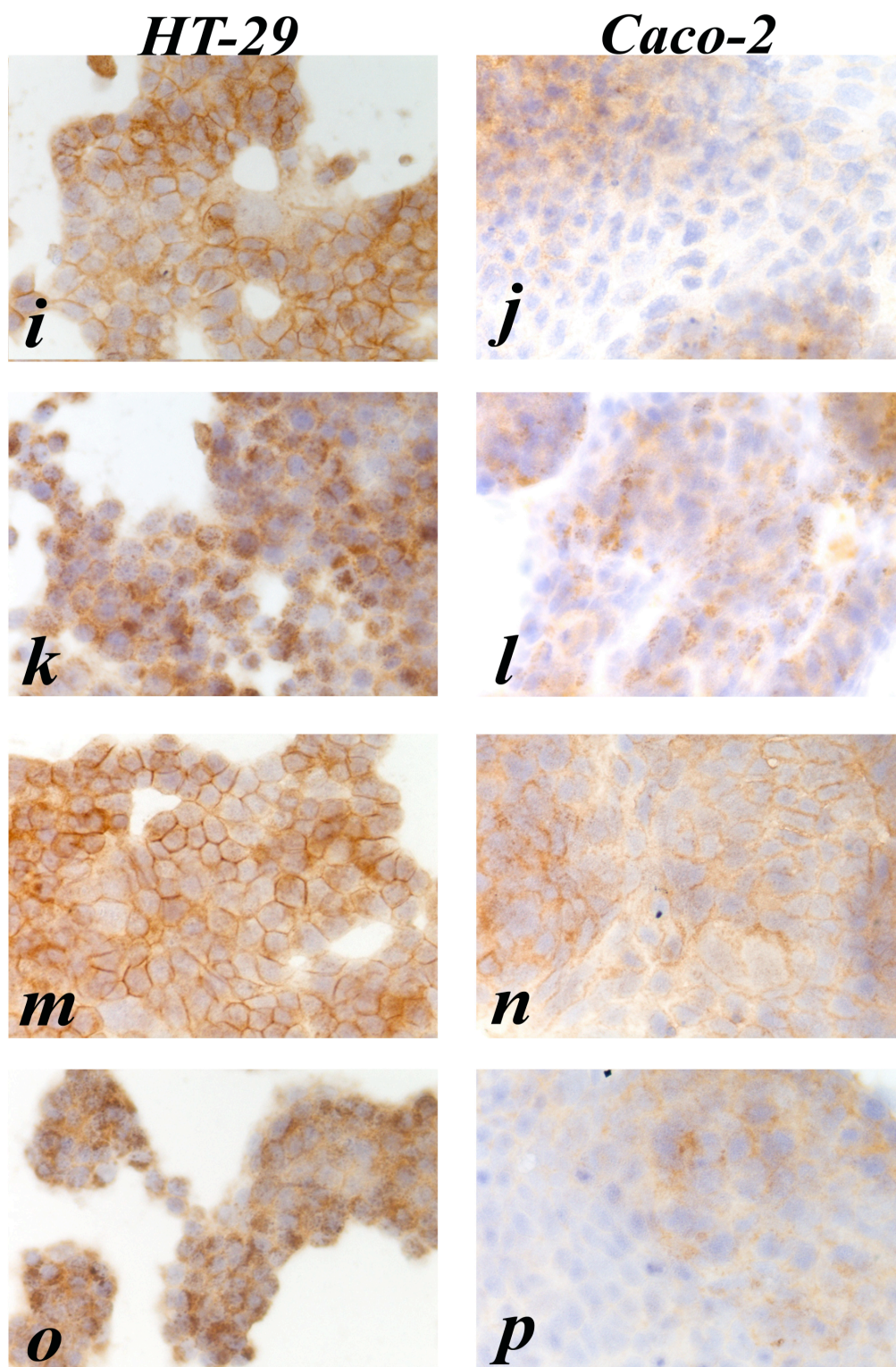


Figura 12. Immunoistochimica su EGFR in cellule HT-29 e Caco-2, rispettivamente. *i*, *j* (trattate con 10 nM cetuximab); *k*, *l* (trattate con 10 nM cetuximab + EGF); *m*, *n* (trattate con gefitinib); *o*, *p* (trattate con gefitinib + EGF).

SEM (Microscopia elettronica a scansione)

Da una prima indagine sull'ultrastruttura delle due linee utilizzate, abbiamo evidenziato una differente morfologia delle cellule HT-29 rispetto alle cellule Caco-2.

Le prime oltre ad essere in generale più piccole, mostravano legami cellulari più evidenti (fig. 13a e 14a) e microvilli più folti e più corti rispetto alle cellule Caco-2.(fig. 13a e 14a inserto). In seguito a trattamento con EGF nelle cellule HT-29 non si osservava una differenza morfologica rispetto alle non trattate (13b e 14b), mentre le cellule Caco-2 mostravano numerose vescicole, un ridotto numero di microvilli coperti da numerose vescicole di endocitosi, e legami cellulari molto più evidenti (fig. 13b e 14b inserti).

Le cellule HT-29 trattate con 5 nM di cetuximab perdevano i loro contatti con le altre cellule e mostravano filipodi e un piccolo numero di microvilli. Nelle cellule Caco-2 inoltre la riduzione dei microvilli era accompagnata dalla perdita della loro posizione eretta e prendevano contatto tra loro nella regione apicale assumendo una morfologia a stella.

Le cellule HT-29 e le cellule Caco-2 trattate con cetuximab 10 nM mostravano la stessa trasformazione morfologica del trattamento a 5 nM (fig 13c e 14c e inserti), associata ad una forte riduzione dei microvilli. Inoltre la perdita dei contatti cellulari nelle cellule HT-29 associata alla presenza di filipodi è stata interpretata come un chiaro segnale di differenziamento verso l'apoptosi. Nelle cellule Caco-2 cambiava l'orientamento dei microvilli in una morfologia a stella, che potrebbe indicare un difetto nell'assorbimento.

Le cellule HT-29 trattate con cetuximab + EGF mostravano alcune vescicole, e la trasformazione morfologica in entrambe le linee cellulari dopo il trattamento combinato mostrava una somma dell'effetti dell'EGF e del cetuximab usati separatamente. (fig 13d e 14d e inserti). Le cellule HT-29 trattate con gefitinib mostrano alcune vescicole e un ridotto numero di microvilli, mentre nelle cellule Caco-2 questa riduzione è molto più pronunciata. I microvilli perdono la loro posizione eretta e prendono contatti tra loro nella

regione apicale assumendo anche qui una morfologia a stella (fig 13e e 14e). In generale la trasformazione morfologia delle cellule HT-29 era sovrapponibile al trattamento con cetuximab, mentre nelle cellule Caco-2 era più pronunciata. Le cellule HT-29 trattate con gefitinib più EGF mostravano lamellipodi e deboli contatti tra le cellule vicine, e la presenza di vescicole. Nelle cellule Caco-2 si osservava invece lo stesso andamento del cetuximab. Entrambe le linee cellulari mostravano l'effetto cumulativo di EGF e gefitinib usati separatamente (13f, 14f e inserti).

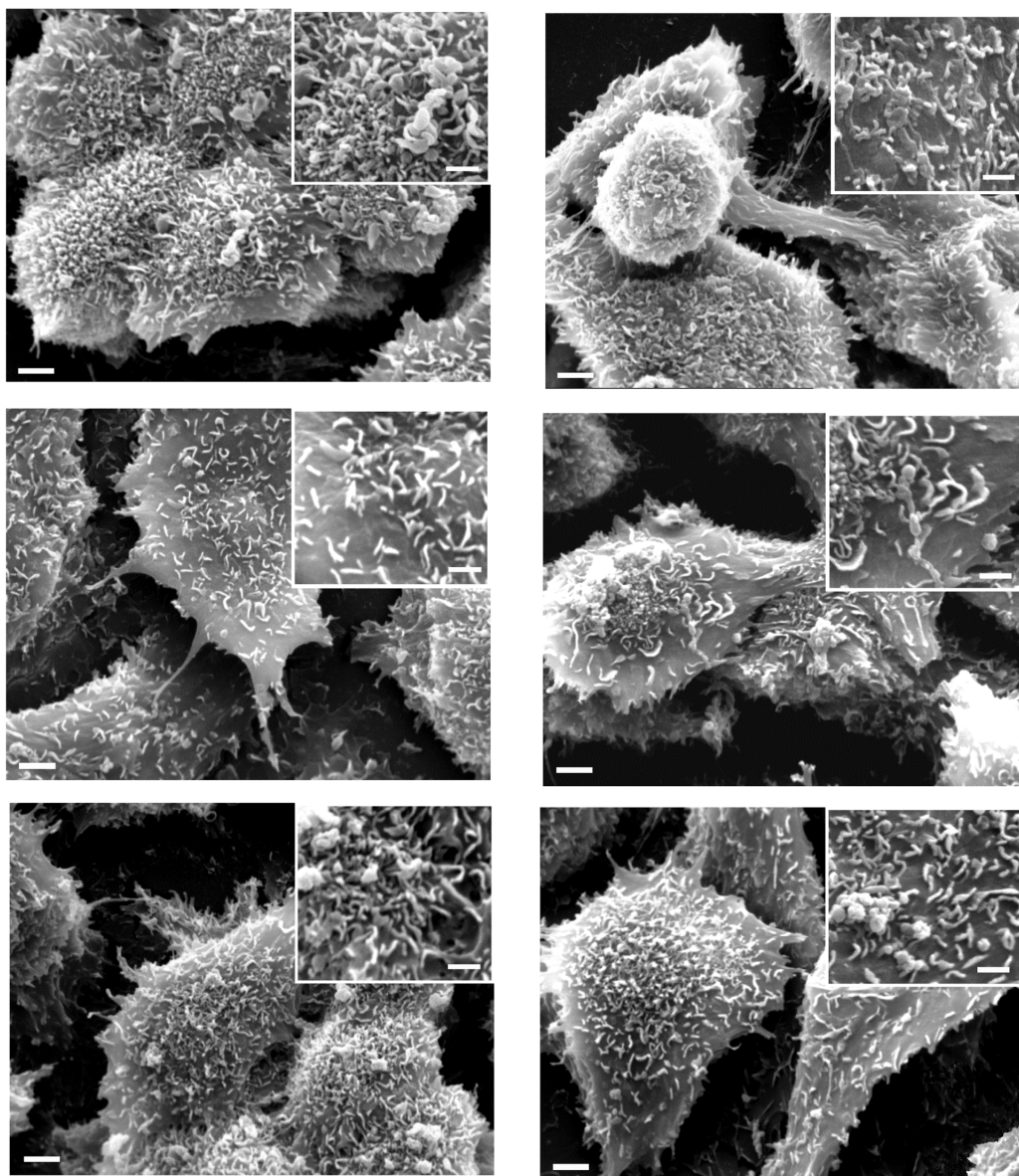


Figura 13. Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM su cellule HT-29) x4000 (bar 2 μm) e inserti (x8000) (bar 1 μm). a: non trattate; b: trattate con EGF; c: trattate con cetuximab; d: trattate con cetuximab + EGF; e: trattate con gefitinib; f: trattate con gefitinib + EGF.

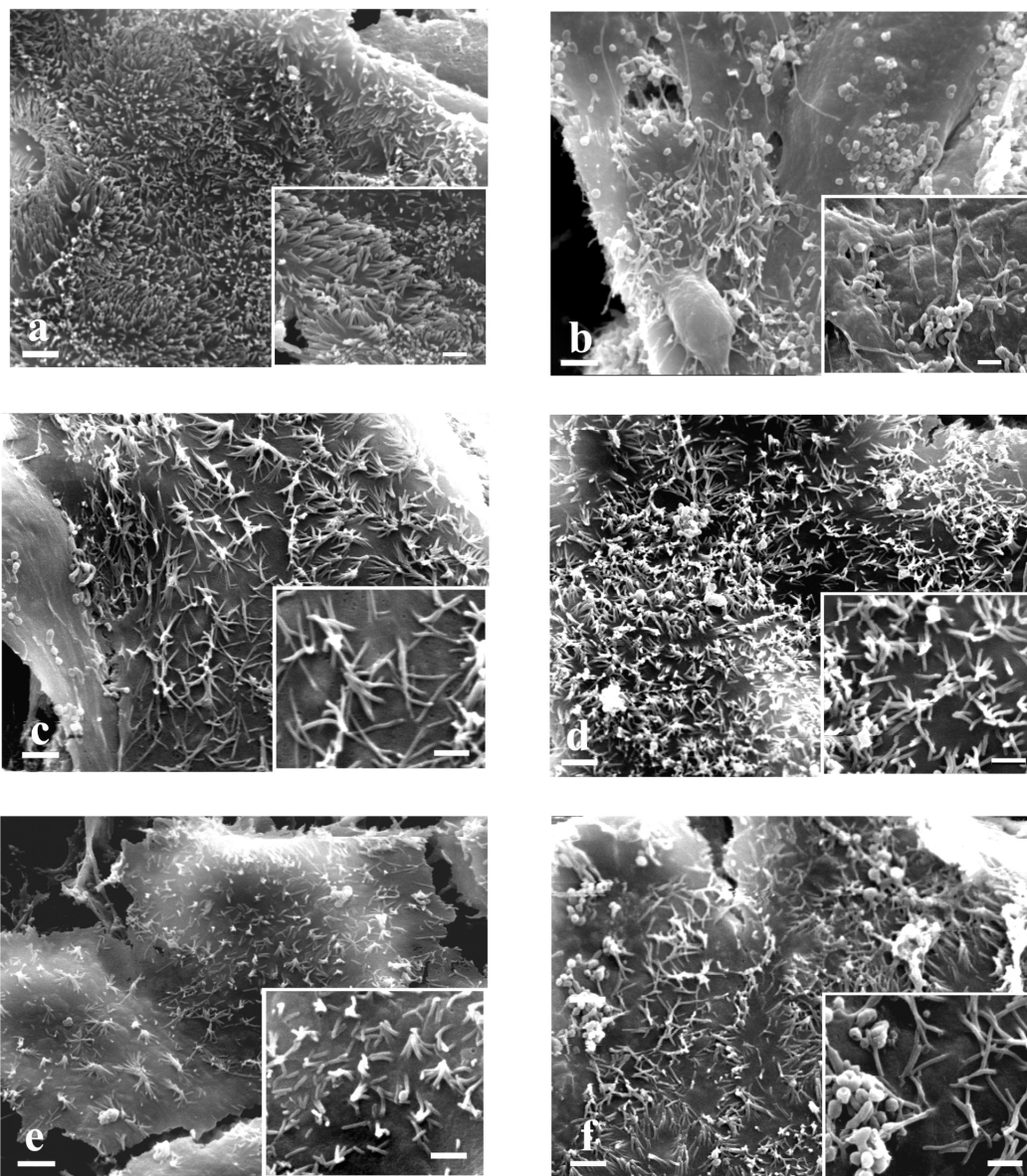


Figura 14 Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM) su cellule Caco-2. x4000 (bar 2 μm) e inserti (x8000) (bar 1 μm). a: non trattate; b: trattate con EGF; c:trattate con cetuximab; d:trattate con cetuximab + EGF; e:trattate con gefitinib; f: trattate con gefitinib + EGF.

Analisi con microarray

Da un punto di vista dell'espressione genica le due linee cellulari rispondevano differentemente ai trattamenti responsabili dell'inibizione di EGFR e al ligando EGF capace di attivarlo. Abbiamo così selezionato i geni sovraespressi i cui livelli di espressione variavano in entrambe le linee cellulari di almeno 2 volte rispetto al non trattato e i geni sottoespressi i cui livelli di espressione variavano in entrambe le linee cellulari di almeno 0.5 volte. Da tale analisi sono risultati 124 geni sovraespressi e 274 sottoespressi in seguito al trattamento con EGF, 49 geni sovra-espressi e 58 sottoespressi in seguito al trattamento con cetuximab, 138 geni sovraespressi e 113 sottoespressi in seguito al trattamento con gefitinib. Nei trattamenti combinati il numero di geni interessati era trascurabile, al punto che abbiamo escluso successivamente queste condizioni da ulteriori studi. La tabella completa dei geni regolati è in appendice I.

<i>Trattamento</i>	<i>E</i>		<i>Cx10</i>		<i>Gb</i>		<i>Cx10 + E</i>		<i>Gb + E</i>	
	giù	su	giù	su	giù	su	giù	su	giù	su
HT-29	855	544	465	287	1253	885	217	459	799	582
Caco-2	1134	915	541	731	577	868	238	57	226	64
Intersezione	274	124	58	49	113	138	3	0	32	10

Tabella 10. Numero dei geni alterato in risposta ai trattamenti. E = EGF 10 nM; Cx10 = cetuximab; Gb = gefitinib; Cx10 + E = cetuximab + EGF; Gb + E = gefitinib + EGF; Giù= sottoespresso di almeno 2 volte; su = sovraespresso di almeno 2 volte.

Abbiamo identificato le vie significativamente alterate in seguito ai trattamenti, facendo uso della distribuzione ipergeometrica descritta in “Materiali e metodi” (tabella 11).

In seguito a trattamento con EGF abbiamo trovato variazioni nella via di segnalazione cellulare riguardante la proteolisi ubiquitina-mediata e nella via di segnalazione di mTOR per quanto concerne le cellule HT29, e variazioni della via dell’apoptosi, della via delle giunzioni strette e della via di segnalazione delle cellule epiteliali nell’infezione da *Helicobacter pilori* per quanto concerne le cellule Caco-2.

In seguito a trattamento con cetuximab le vie di segnalazione cellulare de-regolate nelle cellule HT29 erano quelle relative al calcio, all’apoptosi ed al fosfatidilinositolo (in particolare il gene *ITPR3*, ovvero il recettore del dell’inositolo 1,4,5 trifosfato ed il gene *PLCD*, ovvero fosfolipasi C delta 4), mentre nelle cellule Caco-2 era fondamentalmente deregolata la via del ciclo cellulare (in particolare i geni *Ciclina A*, *Ciclina H*, *p21*, *p57* e *istone deacetilase 2*).

In seguito a trattamento con gefitinib, nelle cellule HT-29 abbiamo trovato sottoregolate le vie di segnalazione riguardanti mTOR, le MAPK, le giunzione strette, la via della comunicazione cellulare e delle giunzioni aderenti, mentre nelle cellule Caco-2 abbiamo identificato le vie del carcinoma a cellule basali e la via di comunicazione cellulare.

E’ interessante notare che la segnalazione della via mTOR nelle cellule HT-29 era comune sia al trattamento con EGF che al trattamento con gefitinib.

Il trattamento con gefitinib reprimeva l'espressione di alcuni geni trovati sovraespressi in seguito al trattamento con EGF ed in particolare: il soppressore di Ras, *RAB2A* (membro della famiglia dell’oncogene *RAS*), *TACSTD1* (trasduttore Tumore-associato del segnale del calcio 1), *MOAPI* (modulatore dell’apoptosi 1), *CDC42BPB* (proteina di legame chinasi CDC42 beta), *RAB5C* (membro della famiglia dell’oncogene *RAS*) e *RASL12* (RAS-like family12).

In entrambe le linee cellulari in seguito al trattamento con gefitinib è risultata essere influenzata la via di comunicazione cellulare ed in particolare i geni del citoscheletro, come la laminina, la fibronectina, il collagene IV e le proteine delle giunzioni comunicanti.

Trattamento	p-val	Vie cellulari coinvolte
HT-29		
E	0,0127	Parkinson's disease
	0,0216	Bisphenol A degradation
	0,027	Nucleotide sugars metabolism
	0,028	ECM-receptor interaction
	0,029	Ubiquitin mediated proteolysis
	0,03	Neurodegenerative disorders
	0,03	Prion disease
	0,03	mTOR signaling pathway
Cx10	0,0001	Ribosome
	0,0288	Calcium signaling pathway
	0,0467	Prion disease
Gb	0,0056	T cell receptor signaling pathway
	0,0115	mTOR signaling pathway
	0,0163	Natural killer cell mediated cytotoxicity
	0,0187	Pentose and glucuronate interconversions
	0,0202	Tight junction
	0,0214	Starch and sucrose metabolism
	0,0242	Insulin signaling pathway
	0,0293	Long-term potentiation
	0,0332	GnRH signaling pathway
	0,0352	TGF-beta signaling pathway
	0,0402	MAPK signaling pathway
	0,0482	D-Glutamine and D-glutamate metabolism
	0,0497	Cell Communication
Caco-2		
E	0,0022	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection
		Tight junction
	0,0034	Adherent junction
	0,0133	Dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA)
	0,0152	Apoptosis
	0,0179	Methionine metabolism
	0,0422	D-Glutamine and D-glutamate metabolism
	0,0436	Selenoamino acid metabolism
	0,0445	Glycan structures - biosynthesis 2
	0,0481	Toll-like receptor signaling pathway
	0,0496	

Cx10	0,0008	Oxidative phosphorylation
	0,0134	Ribosome
	0,0179	Cell cycle
	0,0193	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
	0,0356	Glycan structures - biosynthesis 1
	0,0489	O-Glycan biosynthesis
Gb	0,0001	Ribosome
	0,0106	Basal cell carcinoma
	0,0135	Cell Communication
	0,0308	Valine, leukine and isoleukine degradation
	0,0394	Fatty acid metabolism

Tabella 11. Vie di segnalazione cellulare alterate in seguito ai trattamenti con EGF, cetuximab e gefitinib in cellule HT29 e Caco-2 E = epidermal growth factor 10 nM; Cx10 = cetuximab 10 nM; Gb = gefitinib 1 μ M.

Le vie di segnalazione cellulare erano considerate significative con il $P\text{-val} \leq 0.05$.

Heatmap

Per ogni trattamento abbiamo selezionato i geni con i $p\text{-val} < 0,05$ e una variazione del rapporto di espressione trattato/non trattato superiore a 2 o inferiore a 1/2 in entrambi i tipi cellulari, mentre la “heatmap” è stata costruita facendo uso di un metodo non supervisionato di raggruppamento gerarchico con una distanza di correlazione euclidea fra tutti i campioni e fra i geni selezionati. La risultante heatmap evidenziava che in entrambe le linee il trattamento con cetuximab accendeva i geni che erano spenti dal trattamento con EGF e viceversa per i geni accesi. Nei trattamenti combinati cetuximab + EGF i geni erano meno stimolati rispetto al singolo trattamento, suggerendo una possibile competizione fra i farmaci ed EGF (fig. 15). Infine il gefitinib mostrava un effetto molto più debole del cetuximab, sia da solo che combinato con EGF, i geni coinvolti risultavano poco stimolati, e comunque non appartenevano alla via dall’EGF. Di conseguenza abbiamo escluso gefitinib da ulteriori indagini geniche.

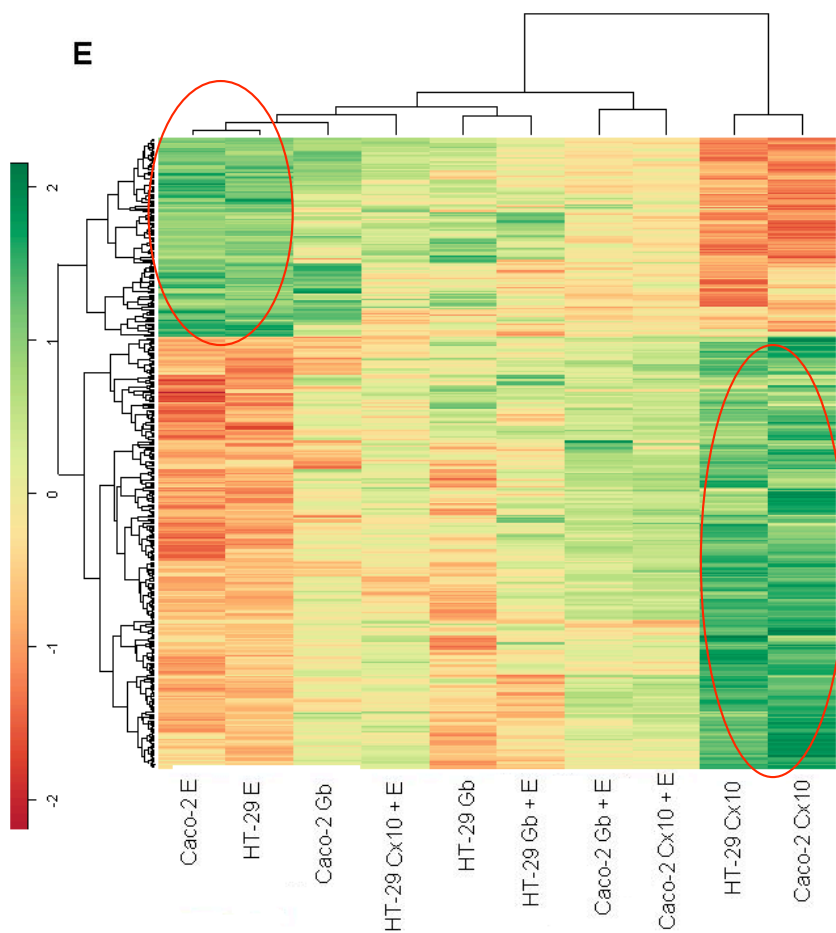


Figura 15. Heatmap dei geni accesi/spenti da EGF di almeno 2 volte. Selezionati per $p\text{-val} < 0.05$.

Geni accesi da EGFR

Allo scopo di identificare i marcatori selettivamente bersaglio di EGFR, ci siamo ulteriormente focalizzati su quei geni, individuati con la heatmap, che oltre ad essere accesi dall'EGF in entrambe le linee cellulari venivano spenti dal cetuximab. Tale approccio ci permetteva di selezionare i geni specifici di questa via, sia in modelli cellulari differenti ed in condizione di accensione/spengimento del segnale EGFR dipendente. I geni che

rispondevano a tale condizione erano 86. Nella tabella 12 sono raccolti quelli con un rapporto superiore a 2.5.

Tabella 12. Geni accessi dall'EGF e spenti dal cetuximab. Selezionati per p-val < 0.05

GenBank.Acc.	Gene	Descrizione
AK023084	C10orf12	Chromosome 10 open reading frame 12
NM_005488	TOM1	Target of myb1 (chicken)
M72393	PLA2G4A	Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
BC009325	SEC24A	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)
NM_031362	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3
NM_006988	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
NM_003088	FSCN1	Fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
AJ250725	ADAMTS12	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 12
AB031481	C6orf15	Chromosome 6 open reading frame 15
AK055683	ZMAT2	Zinc finger, matrin type 2
AB023175	POFUT2	Protein O-fucosyltransferase 2
AF323924	EHD4	EH-domain containing 4
AF274048	UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
NM_012253	TKTL1	Transketolase-like 1
AK054645	CNTNAP3	Contactin associated protein-like 3
AB048207	C5orf26	Chromosome 5 open reading frame 26
AB041035	NOX4	NADPH oxidase 4
AF026851	PET112L	PET112-like (yeast)
AF169035	SGK3	Serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3
BC005116	SSRP1	Structure specific recognition protein 1
NM_000526	KRT17	Keratin 17
NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
U14534	NR1H2	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
BC006527	DUS2L	Dihydrouridine synthase 2-like, SMM1 homolog (S. cerevisiae)
M58285	NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
BC025698	AOAH	Acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)
BC028237	GDF10	Growth differentiation factor 10
NM_013264	DDX25	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25
AF349452	CLDN18	Claudin 18
L04947	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
AF241539	NA	NcamI
J05213	IBSP	Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II)
BC000647	MED9	Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 9 homolog (S. cerevisiae)
AK026398	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1
AF057135	LMX1B	LIM homeobox transcription factor 1, beta
AK075353	OLFML3	Olfactomedin-like 3

III - Parte

Ricerca di microRNA marcatori bersagli di APC

Espressione della forma completa di APC

Le HT29 sono una linea cellulare coloretale umana con caratteristiche biochimiche e fisiologiche simili a quelle di cellule epiteliali coloretali normali (Von Kleist 1975) e pertanto ampiamente utilizzata a scopi sperimentali. Tali cellule hanno una forma mutata del gene APC ed esprimono due proteine tronche nella regione C-terminale rispettivamente di circa 100 kDa e 200 kDa, mentre la forma priva di mutazioni pesa 310 kDa.

L'utilizzo di cellule HT-29-APC ovvero cellule HT-29 stabilmente trasfettate con il gene APC completo e privo di mutazioni sotto il controllo di un promotore inducibile con zinco, ci ha consentito uno studio con l'espressione regolata della proteina.

Inizialmente abbiamo verificato il corretto funzionamento del nostro modello cellulare tramite analisi di Western blot che ha dimostrato che l'espressione della forma selvatica (300 kDa) si osservava già dopo 12 ore dal trattamento e veniva mantenuta per 24-48 ore.

Al contrario, prima dell'induzione venivano osservate solo le forme tronche di 200 kDa e 100 kDa (fig 13). Le cellule utilizzate come controllo (HT-29-GAL, ovvero cellule HT-29 stabilmente trasfettate con il gene *β -Galattosidasi* sotto il controllo di un promotore inducibile da zinco) mostravano solo l'espressione delle forme mutanti di APC in seguito ai trattamenti con zinco, ad un livello equivalente alle cellule HT-29-APC non trattate.

Tali risultati hanno confermato il perfetto funzionamento della regolazione inducibile di APC selvatico in seguito al trattamento con Zinco nelle cellule HT-29-APC.

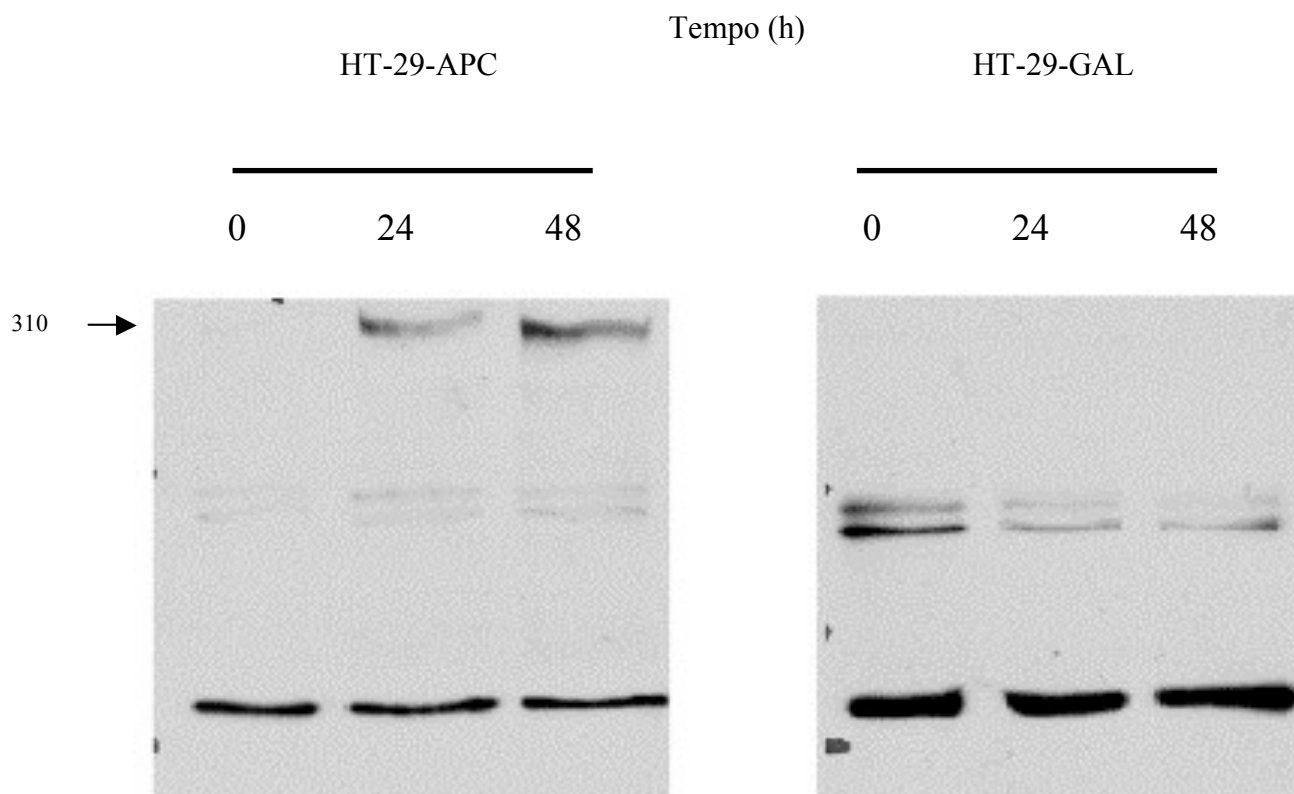


Figura 13. Espressione della proteina APC di lunghezza completa in HT-29-APC. Western blot. Le HT29-APC mostravano l'espressione inducibile di APC completa nel trattamento con zinco (100 μ M) già dopo 24 ore dall'induzione. I dati riportano uno di due esperimenti indipendenti, che restituivano simili risultati. Venivano caricati 40 μ g di proteine totali per condizione, e raccolte esattamente dopo 0 h, 24 h e 48 h dall'iniziale trattamento con zinco. Le HT-29-GAL venivano utilizzate nelle medesime condizioni, e rappresentavano il nostro controllo.

Profili d'espressione di microRNAs mediante microArray

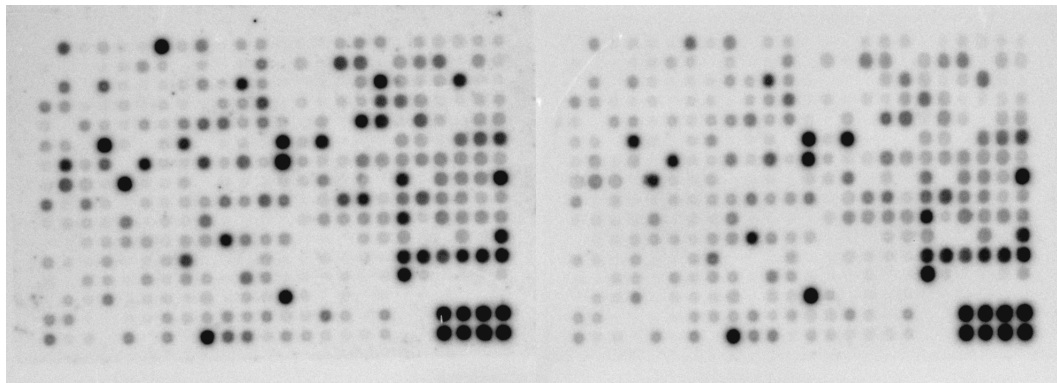
La piattaforma di microRNA microarray utilizzata per gli studi di espressione genica, è stata fabbricata direttamente nell'istituto americano, il Moffitt Cancer Center, in cui ho intrapreso gli studi sui miRNA.

Una libreria di 515 oligodeossinucleotidi antisenso di microRNAs maturi umani e murini è stata sintetizzata e depositata su una membrana Gene Screen Plus usando un dot-blot. L'RNA totale estratto arricchito della componente a basso peso molecolare (smwRNAs) e' stato poliadenilato grazie a una poliadenilato polimerasi (o poli-A polimerasi) ed in seguito ibridizzato su membrane di nylon, oligo arrays. L'intensità del segnale dello spot sulla membrana è stata misurata utilizzando il "phosphorimaging". Questo metodo ci ha offerto una via economica, conveniente ed efficace per analizzare simultaneamente un gran numero di microRNA.

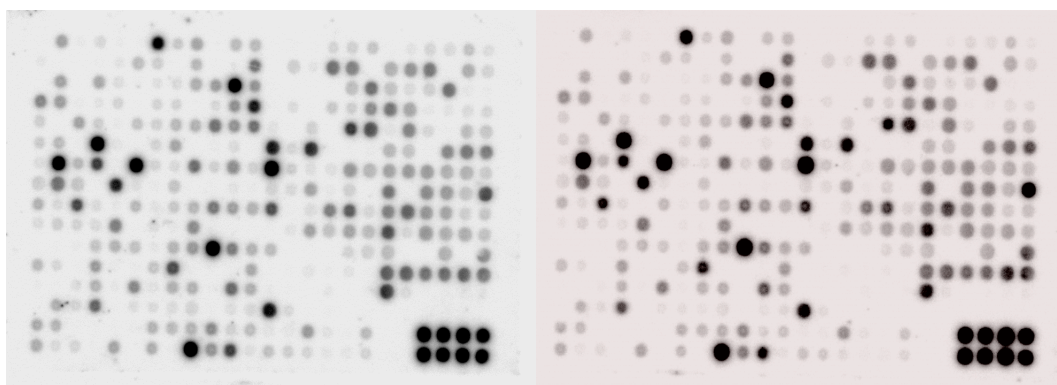
Verificata l'induzione di APC selvatica già dopo 24 h dal trattamento, abbiamo estratto l'RNA totale di cellule HT-29-APC e HT-29-GAL a 0 ore (controllo) e 24 ore dopo l'induzione con zinco e abbiamo ibridato un totale di 8 microarray nelle condizioni descritte (in replicato) (figura 14).

0 h

24 h



HT-29-APC



HT-29-GAL

Figura 14. Microarray della frazione di microRNA estratti da cellule HT-29-APC indotte con zinco per 0 e 24 h e da cellule di controllo HT-29-GAL indotte con zinco a 0 h e 24 h.

Analisi dei dati dei microRNAs microArray

I dati ottenuti sono stati importati e processati con il software Rv5. Nell'analisi abbiamo applicato una prima normalizzazione a quantile, in seguito alla quale abbiamo escluso tutti gli "spot" murini, di normalizzazione e gli spot vuoti. Applicando il modello lineare abbiamo selezionato i miRNA che variavano dalla condizione HT-29-APC-0 a HT-29-APC-24, [Rapporto HT-29-APC-24/HT29-APC-0 maggiore di 1] ma che restavano pressoché immutati nelle condizioni di HT29-GAL-0 e HT-29-GAL-24 [HT-29-GAL 24/HT29-GAL-0 uguale a 1]. I geni sono stati selezionati per p-val senza applicare nessuna

correzione. E il valore della variazione di espressione è stato calcolato in logaritmo naturale.

I microRNA regolati sono stati visualizzati in una “heatmap” (Fig 15).

Da questa visualizzazione si evidenziavano chiaramente i geni che in seguito a induzione di APC venivano spenti, mentre questi stessi geni rimanevano invariati nella condizione HT-29-APC 0 e nelle due HT-29-GAL (0 e 24). Inoltre il raggruppamento gerarchico distingue perfettamente le cellule HT29-APC dopo 24 ore di induzione da tutte le altre condizioni.

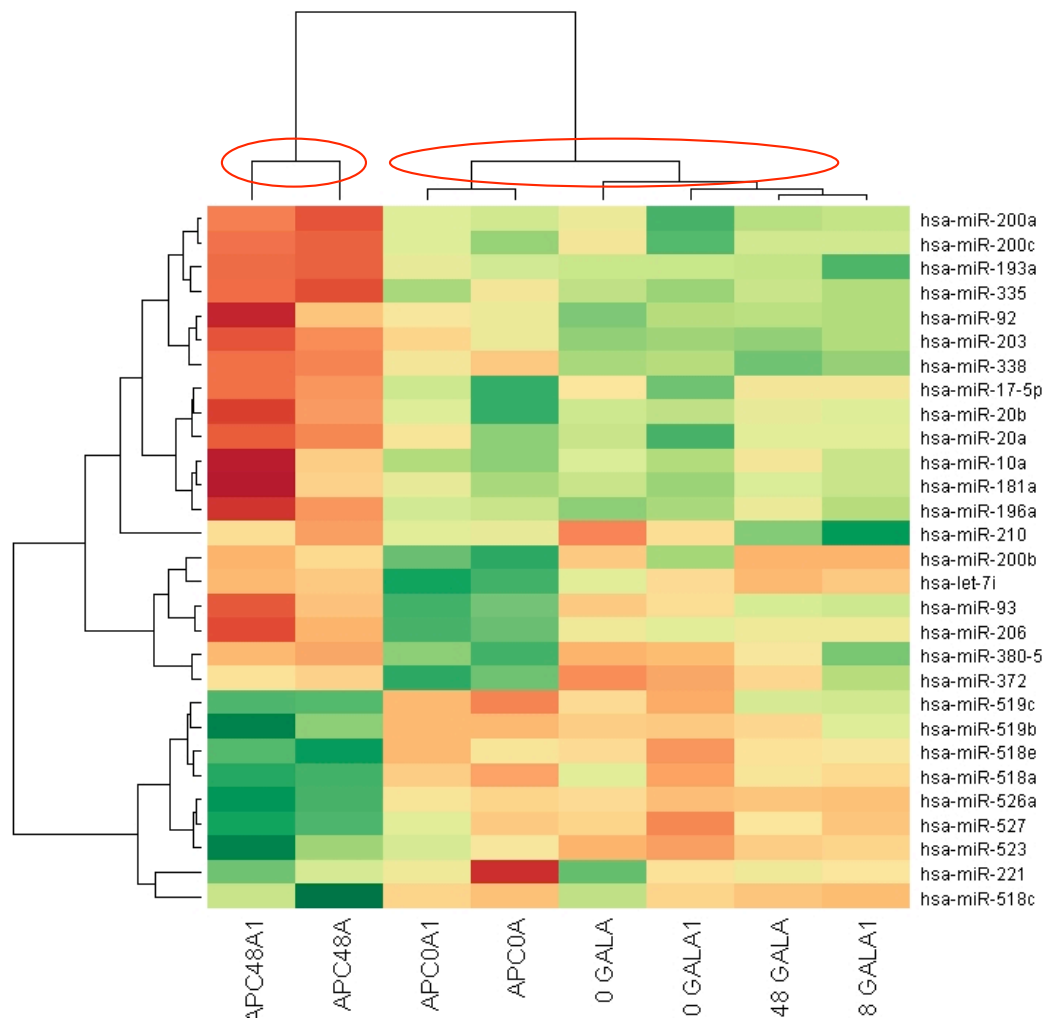


Figura 15. Heatmap dei microRNA regolati da APC.

La “heatmap” ci dà la possibilità di seguire, per mezzo di visualizzazione grafica, l’andamento dei geni di interesse, in tutte le condizioni sperimentali.

I microRNA con il più alto rapporto di espressione tra le cellule HT-29-APC a 0 h e 48 h sono stati selezionati e sono visibili in tabella 13.

Il rapporto tra il livello di espressione di tali geni in cellule HT-29-GAL a 0 h su quello a 48 h rimane pressoché costante.

Tabella 13. Tabella dei valori di espressione dei miRNA spenti/accesi da APC in cellule HT29-APC a 0 h e a 24 h e in cellule HT29-GAL a 0 h e a 24 h. I valori sono presentati in logaritmo naturale e in ordine decrescente. I geni sono stati selezionati tutti per p-val minore 0.05.

Nome	APC24/APC0	GAL 24/GAL0
hsa-miR-17-5p	1.85280516	1.186385829
hsa-miR-20b	1.754723232	1.085272147
hsa-miR-20a	1.753452766	1.294832342
hsa-miR-200c	1.735328446	1.070238507
hsa-miR-181a	1.713796975	1.093058204
hsa-miR-200b	1.703285247	1.27785108
hsa-miR-200a	1.677402591	1.052464969
hsa-miR-196a	1.620160978	1.153407748
hsa-let-7i	1.618608065	1.13430717
hsa-miR-92	1.616955256	1.093663173
hsa-miR-10a	1.537538694	1.067432071
hsa-miR-335	1.494467871	1.034813094
hsa-miR-203	1.466152589	1.027405685
hsa-miR-380-5p	1.435295497	0.801711405
hsa-miR-93	1.420430317	0.892381738
hsa-miR-518c	0.721156451	1.135176429
hsa-miR-519b	0.704724167	0.934943724

hsa-miR-519c	0.681940737	0.856526408
hsa-miR-518a	0.669313157	0.985400216
hsa-miR-518e	0.667077739	0.907348003
hsa-miR-527	0.661002687	0.911264686
hsa-miR-523	0.522667234	0.82657001
hsa-miR-526a	0.469008928	1.051046121

Dai risultati ottenuti dagli array abbiamo potuto osservare con molto interesse che alcuni microRNA (miR-17, miR-20a, miR-92) la cui espressione risultava diminuita in seguito all'induzione di APC, erano già bersagli conosciuti di c-Myc, un oncogene attivato da β -catenina. Questo era perfettamente coerente con la letteratura, poiché alla degradazione di β -catenina, dovrebbe seguire un calo di espressione di c-Myc, e quindi anche dei suoi miRNA bersaglio, che noi osserviamo in tabella 13.

Espressione di c-Myc

A questo punto abbiamo voluto investigare, mediante analisi Western blot, anche l'espressione di c-Myc nel nostro modello sperimentale. (Fig.16).

In cellule HT-29-APC dopo 24 ore dall'induzione di APC, la proteina c-Myc risultava effettivamente diminuita, lasciando ipotizzare un suo diretto coinvolgimento nella deregolazione di miR-17, miR-20 e miR-92 nel nostro modello sperimentale. Abbiamo pertanto ritenuto di scartare questa famiglia oncogenica come bersaglio diretto di β -catenina.

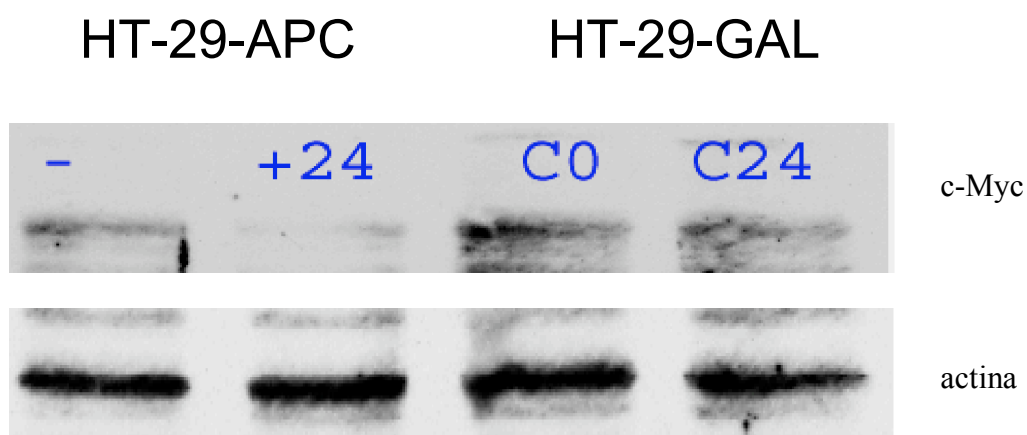


Figura 16. Espressione della proteina c-Myc (67 kDa) in Western blot. Le cellule HT-29-APC mostravano la diminuzione della proteina dopo 24 dall'induzione di APC. Nelle cellule HT-29-GAL di controllo questi livelli rimanevano invariati.

APC reprime l'espressione di hsa-miR-20

Con la tecnica del Northern Blot abbiamo potuto validare ulteriormente alcuni dati dei microarray. In particolare abbiamo analizzato miR-20a, che dai dati degli array mostrava un calo di espressione in seguito all'induzione di APC completa. I risultati (fig. 20) mostrano una riduzione dei livelli d'espressione di miR-20 nelle cellule HT-29-APC a 24h dall'induzione di APC, mentre i livelli di espressione di miR-20 in cellule HT-29-GAL di controllo rimanevano invariati in seguito all'induzione. U6 rappresenta un microRNA di controllo del caricamento.

APC reprime l'espressione di hsa-miR-20a

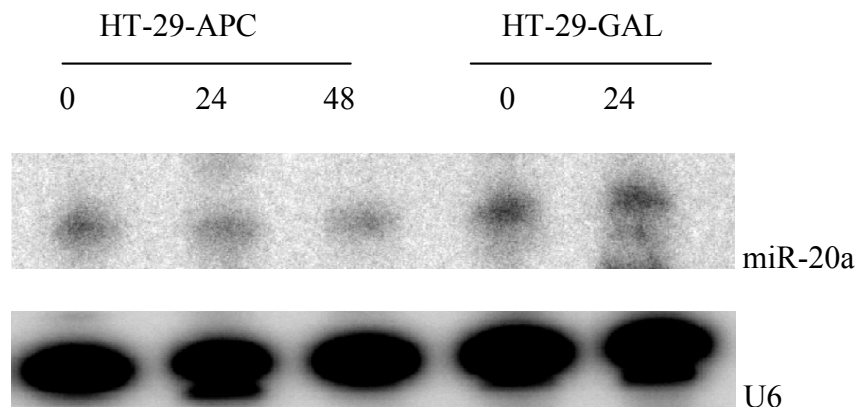


Figura 17. Northern blot sull'espressione di miR-20 in cellule HT-29-APC e HT-29-GAL. miR-20a viene de-regolato dopo 24 e 48 ore di induzione di APC. Non risulta invece variato nelle cellule di controllo HT-29-GAL.

Studio della famiglia microRNAs hsa-mir-200

A questo punto abbiamo deciso di concentrarci su hsa-miR200a/b/c, un'altra famiglia di microRNAs che risultava regolata da APC che risultava avere un alto rapporto tra il livello di espressione in cellule HT-29-APC a 0 h su quello a 48 h. Le sequenze dei microRNA maturi sono raccolte in tabella 20.

Questa famiglia di miRNA è costituita da 5 membri, nel dettaglio miR-a/b/429, localizzati sul cromosoma 1 e trascritti come unica unità policistronica, e miR-200c/141 localizzati invece sul cromosoma 12.

Questi due cluster sono stati associati in un'unica famiglia genica poichè hanno un'alta omologia di sequenza come si può già osservare dalle sequenze riportate in tabella 14.

Nome	Sequenza microRNA maturo	Localizzazione genomica
hsa-mir-200b	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	1: 1092347-1092441 [+]
hsa-mir-200a	UAAUACUGCCUGGUAAGAUGA	1: 1093106-1093195 [+]
hsa-mir-429	UAAUACUGUCUGGUAACACCGU	1: 1094248-1094330 [+]
hsa-mir-200c	UAAUACUGCCGGGUAAGAUGGA	12: 6943123-6943190 [+]
hsa-mir-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	12: 6943521-6943615 [+]

Tabella 14. Famiglia miR-200. Sequenze dei microRNA maturi e rispettiva localizzazione genomica.

Quantificazione di hsa-miR-200 mediante qPCR Real Time

Per validare la nostra ipotesi, ovvero che i membri della famiglia miR-200 fossero sotto il controllo trascrizionale di β -catenina, abbiamo effettuato un'analisi di Real-Time PCR. Per far ciò abbiamo innanzitutto effettuato una retrotrascrizione utilizzando dei primer con una struttura a forcina, capaci di ibridizzare e retrotrascrivere RNA anche di 22 nucleotidi, la lunghezza appunto dei microRNA maturi.

Il risultato della Real Time PCR in cellule HT-29-APC mostrava una diminuzione nei livelli di espressione di tutti e 5 i membri della famiglia miR-200 dopo 24 h dall'induzione di APC selvatico (fig. 18), mentre in cellule HT-29-GAL i livelli di espressione non variavano in seguito all'induzione con zinco (fig. 19).

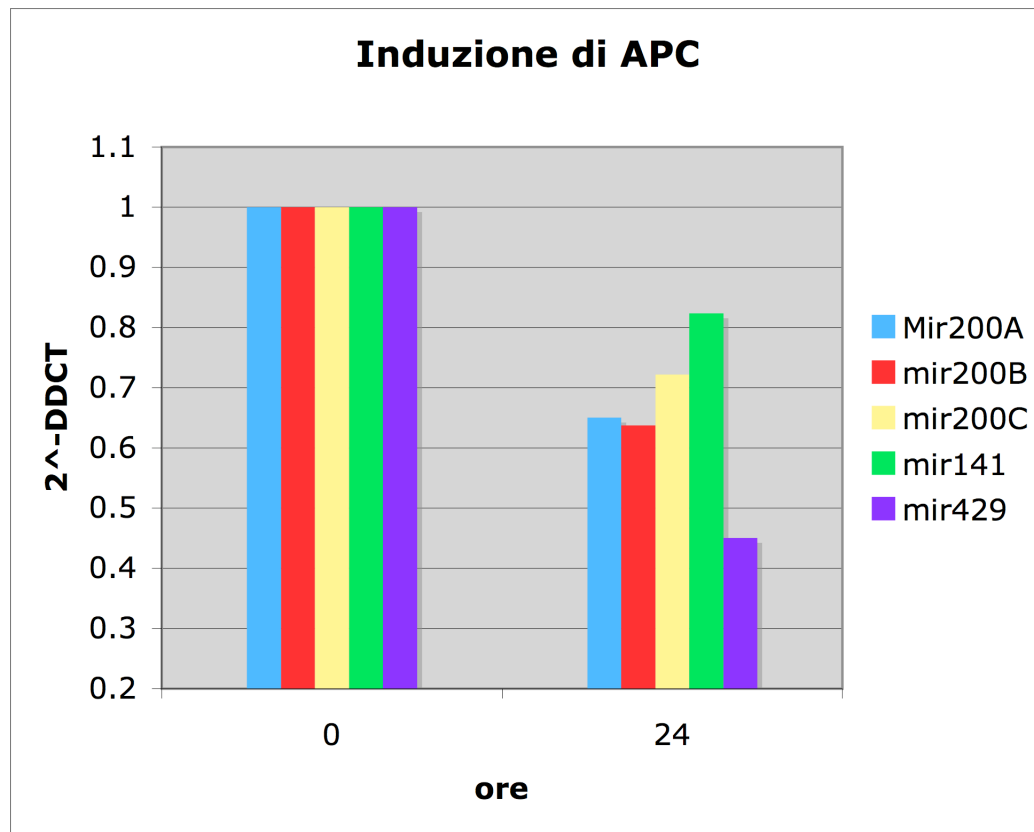


Figura 18: APC reprime l'espressione dei microRNA miR-200a/b/c/141/429 dopo 24 ore dall'induzione della sua forma completa, in cellule HT-29-APC.

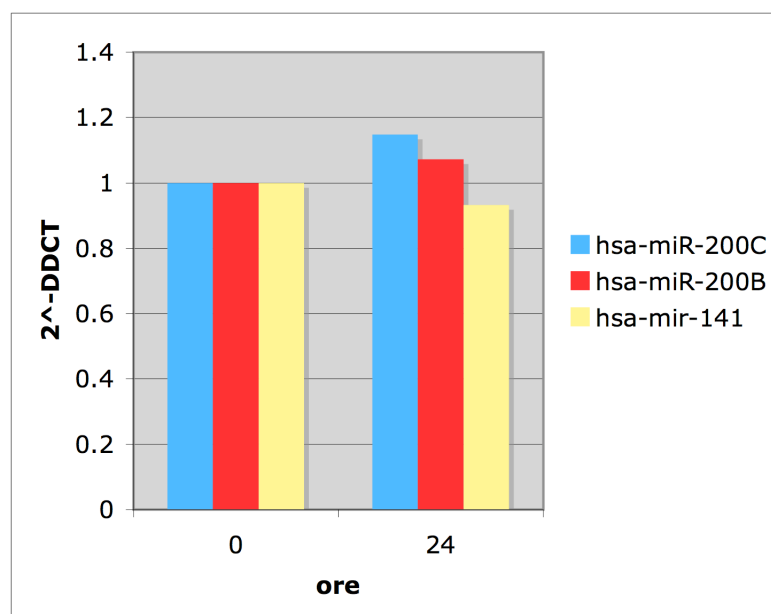


Figura 19. L'espressione dei microRNA 200C/B/141 non risulta alterata dal trattamento con zinco in cellule HT-29-GAL.

Studio del promotore di miR-200 e ricerca di sequenze consenso per il legame di fattori di trascrizione TCF/LEF.

A questo punto ci è sembrato opportuno realizzare uno studio bioinformatico del promotore di miR-200, per cercare la presenza di sequenze consenso per il legame del complesso trascrizionale β -catenina/TCF/LEF. Questo sito di legame, chiamato TBE, legato direttamente da TCF4 è dato dalla sequenza CTTTG(T/A)(T/A).

Cromosoma 1

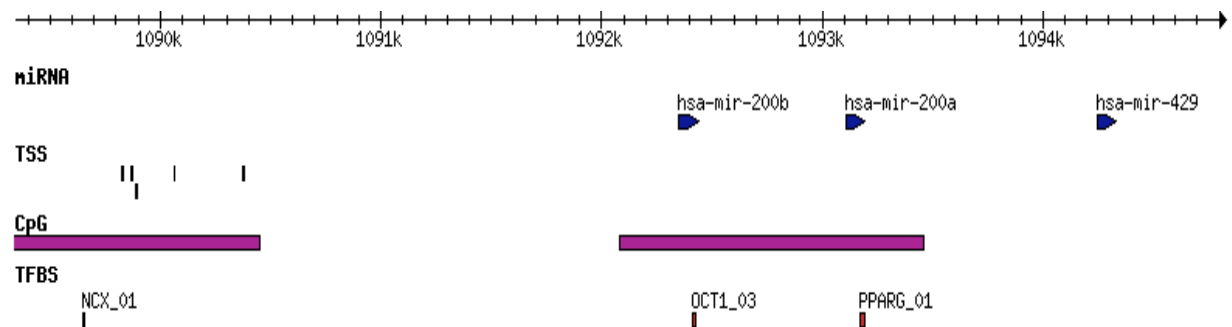


Figura 20. Visualizzazione schematica del promotore del cluster miR-200a/b/429 localizzato sul cromosoma 1. Fonte <http://microrna.sanger.ac.uk/>

	Realativo al cromosoma			Relativo a hsa-mir200b			
ID	Start	End	Strand	Start	End	Strand	Score
TSS1	1088480	1088483	1	-3867	-3864	1	0.994301
TSS2	1088918	1088919	1	-3429	-3428	1	0.990669
TSS3	1089827	1089828	1	-2520	-2519	1	0.991195
TSS4	1089865	1089871	1	-2482	-2476	1	0.997499
TSS5	1089889	1089893	1	-2458	-2454	1	0.995812
TSS6	1090064	1090066	1	-2283	-2281	1	0.993259
TSS7	1090375	1090379	1	-1972	-1968	1	0.996649
CpG Islands	1087907	1090447	0	-4440	-1900	0	287
CpG2	1092085	1093461	0	-262	1208	0	244

Tabella21. TSS: ipotetici siti di inizio della trascrizione. Isole CpG: regioni nel promotore ad alto contenuto in GC che sono soggette a fenomeni di silenziamento per metilazione .

Da un' analisi bioinformatica sono risultati 2 siti di legame per TCF/LEF [CTTTG(A/T)(A/T)] in posizione 1091286-109129 e 1090010-1090017 sul promotore del cluster miR-200b/a/429. In particolare entrambi i siti sono inseriti in un'isola CpG, un motivo evolutivamente conservato che è una caratteristica molto comune nei promotori. Inoltre uno dei due è a monte di un predetto sito di inizio della trascrizione TSS7. Questo dato è importante perché il promotore di questa famiglia di microRNA non è ancora stato caratterizzato. Di conseguenza trovare un sito di legame del complesso trascrizionale subito a monte di un sito di inizio della trascrizione lo rende ancora più efficace.

Anche il promotore di miR-200c e miR-141 sul cromosoma 12, presentava una sequenza consenso TBE in posizione -1642 rispetto alla sequenza del miR-200C, coordinate 12: 6941481-6941486.

Beta catenina induce hsa-miR-200

Per validare l'interazione diretta di beta catenina con il promotore della famiglia miR-200, abbiamo trasfettato in cellule HEK-293 un plasmide che esprimeva la forma mutata e quindi non degradabile di beta catenina e un plasmide vuoto di controllo. Le cellule HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells,) sono una linea cellulare che non esprime miR-200. Tramite analisi di Northern Blot abbiamo osservato un'espressione di hsa-miR-200a in cellule HEK 293 trasfettate con 4 e 8 μ g di plasmide, mentre sono risultate negative le trafezioni con concentrazioni di plamide inferiori a 1 μ g e quelle trasfettate con il vettore vuoto (Fig 23). U6 rappresenta il microRNA per il controllo del caricamento.

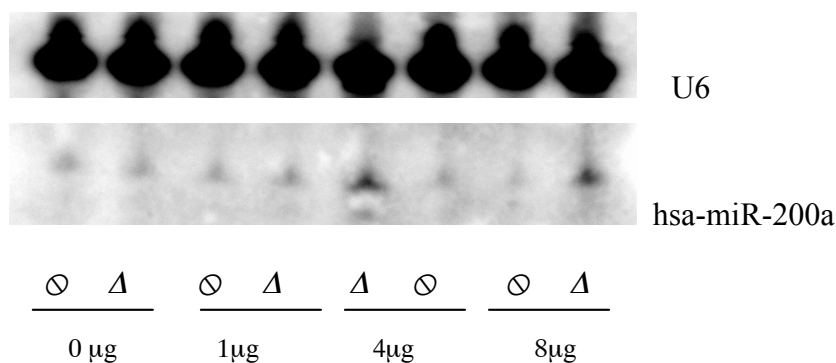


Figura 23. Analisi in northern blot dell'espressione di miR-200a in seguito a trasfezione di β -catenina. ⊙: plasmide vuoto di controllo, Δ: beta catenina mutata, non degradabile.

Capitolo 5

Discussione e conclusioni

Se la diffusione delle cellule del tumore è un evento precoce nella tumorigenesi, allora deve essere possibile individuare la loro presenza nella circolazione sanguigna prima che il tumore primario sia abbastanza grande da essere individuato dagli esami standard di screening [79].

Sebbene la rilevazione delle cellule tumorali circolanti (CTCs) nel sangue periferico abbia suscitato estremo interesse fin dal secolo scorso [82], è solo di recente che ci si è potuti

avvalere di metodi molecolari altamente sensibili e specifici, capaci di rilevare fino a 5 cellule diluite in 1 ml di sangue periferico.

Lo scopo dell'intero progetto è stato quello di usare il profilo di espressione genica in diversi approcci nel tentativo di identificare un insieme di geni che potessero essere utilizzati per la rilevazione di CTCs nel sangue periferico di pazienti affetti da cancro colorettale. Il nostro metodo si propone di utilizzare una tecnica standardizzata di PCR che rispecchia i criteri dell' Organizzazione Mondiale della Sanità: accettabilità, realizzabilità, alta specificità ed alta sensibilità [57].

La tecnologia dei microarray a DNA consente lo studio dell'espressione genica di un grande numero dei geni contemporaneamente. In particolare tale tecnica ha la capacità di individuare un cambiamento dell'espressione fra due condizioni. Nella prima parte di questo progetto abbiamo sfruttato la tecnica dei microarray per confrontare RNA estratto dalla mucosa del colon rispetto a quello estratto dal sangue; nella seconda parte del progetto, invece, la tecnica dei microarray è stata utilizzata su RNA estratto da linee cellulari di adenocarcinoma per individuare i geni indotti in seguito ad attivazione/blocco dell'EGFR.

Infine la terza parte del progetto si è concentrata sui microRNA bersaglio di APC, un gene particolarmente noto in letteratura per la sua importanza nella genesi del cancro del colon. L'approccio è stato quello di promuovere la sua induzione, in maniera finemente controllata, in cellule che ne esprimono una isoforma tronca e quindi non funzionante.

I-Parte

Nella prima parte del progetto abbiamo effettuato il confronto tra RNA estratto da mucosa di colon patologico o normale ed RNA estratto da sangue periferico di soggetti

normali. Gli esperimenti sono stati effettuati su un gruppo di campioni per favorire la rilevazione dei geni coerentemente sovra-regolati [81].

Abbiamo così selezionato, fra i 20.000 geni studiati, i 10 che godevano del miglior rapporto tra i livelli di espressione nel colon e i livelli di espressione nel sangue in tutti e tre gli esperimenti. Tramite analisi di RT-PCR qualitativa, abbiamo analizzato tre di questi geni (*TMEM69*, *RANBP3* e *PRSS22*) su campioni di RNA estratto da sangue periferico di soggetti sani. E' importante sottolineare che anche altri studi hanno considerato la possibilità di utilizzare i livelli di espressione di *PRSS22* come potenziale marcatore del tumore [83]. Questo gene codifica infatti per una proteina, la prosemina, che è stata osservata in diversi tipi di cellule tumorali del pancreas, della prostata, dell'ovaio e del tessuto nervoso. Tuttavia la positività di tutti e tre i candidati marcatori già in un piccolo insieme di campioni di sangue di controllo, non ci ha permesso di considerare questi geni come possibili marcatori.

Tale risultato non risultava comunque inatteso, dato che dallo studio dei microarray non erano emersi geni altamente sovra-espressi nel colon con livelli di espressione nulli nel sangue.

E' da tenere in considerazione comunque il fatto che anche altri studi che hanno ricercato geni marcatori di cellule epiteliali nel sangue hanno riscontrato difficoltà simili alle nostre. Ad esempio era stato proposto come possibile marcatore il gene della citocheratina 20, (*KRT20*) [84]. Tuttavia l'espressione di *KRT20* nei canceri colorettali è stata descritta come altamente variabile in differenti tipologie tumorali, con livelli di espressione che possono differire di oltre tre ordini di grandezza e con una percentuale di tumori che addirittura non esprime affatto il gene [85, 86].

Ed infatti i livelli di espressione di *KRT20* erano in un intervallo di rilevazione basso nella nostra serie. I nostri risultati, sostenuti comunque dalla recente letteratura, sembrano

fornire un' indicazione su scala genomica, ovvero che possa non esistere un gene marcatore adatto e coerente per la rilevazione di cellule epiteliali nel sangue [87].

Tuttavia bisogna considerare che la nostra analisi ha studiato 20.000 su 25.000 geni conosciuti, e che molti geni potrebbero essere espressi in isoforme di splicing tessuto specifica. In questa prospettiva dovrebbero essere realizzati nuovi studi.

Ad ogni modo potrebbero in futuro essere utilizzati metodi alternativi per distinguere fra i campioni positivi e negativi, come ad esempio l'utilizzo di analisi quantitative (qRT-PCR) piuttosto che qualitative, l'uso di un pannello di marcatori in modo da raggiungere un alto significato statistico [85-87], l'identificazione di un locus funzionale [89] oppure ancora la ricerca di marcatori specifici per sottotipologie tumorali [90].

II - Parte

In seguito alla ricerca di geni epitelio-specifici che non ha portato all'identificazione di marcatori appropriati, abbiamo focalizzato il nostro studio sull'EGFR, dato che questo recettore risulta sovra-espresso nell'80% dei canceri colorettali [17] ed è già stato studiato come marcatore ematico per la ricerca di cellule tumorali circolanti nei pazienti con cancro del colon. Numerosi studi descrivono EGFR come marcatore altamente specifico [90-92], risultando direttamente rilevabile nel 12.5% dell'RNA estratto dal sangue di pazienti affetti da cancro del colon ed assente nell'RNA estratto dal sangue di individui sani [92].

Sfruttando la tecnica "nested-PCR" altri studi scientifici hanno cercato di aumentare la sensibilità dell'analisi, riuscendo a rilevare il 59% dei pazienti affetti da cancro del colon, ma dando come falsi positivi circa il 10% dei donatori sani [93].

Abbiamo così pensato che un buon metodo per aumentare la sensibilità dell'identificazione potesse essere quello di identificare un pannello di marcatori, scelti tra i bersagli di EGFR. Il pannello infatti migliora la significatività statistica del test.

Le difficoltà nell'intraprendere uno studio sull'EGFR possono essere molte dato che è un recettore pleiotropico e la risposta biologica in seguito alla sua attivazione è caratterizzata da mitogenesi, apoptosi, migrazione, differenziazione e de-differenziazione. Inoltre i suoi molteplici effetti possono variare in base al tipo cellulare, al contesto, alla densità cellulare, al tipo di matrice, alla presenza/assenza di altre citochine e perfino alla posizione all'interno di una colonia di cellule [94]. Inoltre, i ligandi di EGFR sono numerosi ed alcuni di loro possono legarsi indifferentemente anche ad altri membri della famiglia erbB, di cui EGFR fa parte. Ad ogni modo EGF, TGF-alfa e anfiregulina si legano esclusivamente a erbB1 [95].

Al fine di studiare i target a valle della cascata di trasduzione innescata da EGFR, nei nostri esperimenti abbiamo scelto di utilizzare EGF (il più noto e conosciuto tra i ligandi naturali di EGFR) per indurre l'attivazione di EGFR, mentre i farmaci cetuximab e gefitinib per indurre il blocco.

Per migliorare lo studio di eventuali geni effettori dell'attivazione/blocco di EGFR, abbiamo in primo luogo caratterizzato morfologicamente le due linee cellulari di adenocarcinoma utilizzate (HT-29 e Caco-2) come modelli sperimentali.

Dagli studi di citofluorimetria le linee si presentavano già abbastanza differenziate al momento del trattamento, mostrando entrambe un valore superiore al 60% nella distribuzione in fase G0/S del ciclo cellulare.

Tramite analisi di immunoistochimica abbiamo valutato il livello di espressione della proteina EGFR, dato che a tal riguardo la letteratura fornisce dati tra loro fortemente discordanti [96-100] ed abbiamo potuto così osservare che le cellule HT-29 presentavano

livelli molto più elevati di espressione della proteina EGFR rispetto alle cellule Caco-2, che ne presentavano un'espressione debole-moderata.

Le due linee sono state successivamente caratterizzate anche tramite analisi di microscopia elettronica a scansione, da cui sono risultate alcune caratteristiche comuni, come la tipica struttura degli enterociti, caratterizzata da giunzioni strette fra le cellule adiacenti e da un orletto a spazzola costituito di microvilli sulla superficie apicale delle cellule. Le due linee cellulari manifestavano però differenze morfologiche relative all'adesione cellulare fra cellule adiacenti, che risultava molto più evidente nelle cellule Caco-2, e alla lunghezza dei microvilli, che risultavano più corti nelle cellule HT-29.

In seguito al trattamento con EGF in generale le cellule Caco-2, in cui la presenza di EGFR a livello di membrana è moderata, hanno mostrato evidenti rimodellamenti della membrana plasmatica e dei legami cellulari e una diminuita vitalità, suggerendo un effetto apoptotico da parte dell'EGF. Ciò è stato in seguito confermato dai dati di espressione genica, nei quali tra le vie più alterate in seguito ai trattamenti con EGF abbiamo trovato la via dell'apoptosi, quella delle giunzioni strette e quella delle giunzioni aderenti.

Le cellule HT-29, a differenza, non mostravano variazioni fenotipiche con questo trattamento, fatta eccezione per la comparsa di vescicole di endocitosi. Queste potrebbero essere associate all' internalizzazione dell'EGFR in seguito al legame di EGF. A supportare questa ipotesi c'è l'evidenza che una delle vie geniche coinvolte in questo trattamento, è proprio la via della proteolisi mediata da ubiquitina, che può suggerire la degradazione dell' EGFR internalizzato, come osservato nell'immunoistochimica.

Per quanto riguarda il blocco dell'EGFR, invece, abbiamo innanzitutto osservato che le concentrazioni dei farmaci anti-EGFR utilizzati (cetuximab e gefitinib) raccomandate dall'industrie farmaceutiche produttrici, avevano effetto sul fenotipo già dopo 24 ore, in particolare sulla morfologia della membrana plasmatica e del citoscheletro.

Per quanto riguarda i livelli di espressione genica nelle due linee cellulari utilizzate, abbiamo osservato che in generale il trattamento con cetuximab ha interessato meno vie rispetto al trattamento con gefitinib. Ciò è coerente con una maggiore specificità d'azione di questo farmaco, dovuta al fatto che quest'ultimo è un anticorpo monoclonale specifico per EGFR, mentre il gefitinib, essendo un inibitore di tirosina chinasi, può interagire con numerose altre proteine chinasiche cellulari.

Nel dettaglio il cetuximab comportava in entrambe le linee cellulari alcuni cambiamenti morfologici, come la riduzione consistente nei microvilli, che nelle cellule Caco-2 perdevano anche la posizione eretta, per assumere una conformazione a stella. Probabilmente queste caratteristiche sono responsabili di un difetto cellulare nella funzione di assorbimento. Inoltre in seguito al trattamento con cetuximab, le cellule HT-29 hanno mostrato alcune caratteristiche apoptotiche, come la perdita di contatti tra le cellule e la presenza di filipodi.

La procedura di raggruppamento agglomerante gerarchica conferma che il profilo di espressione genica indotto dal trattamento del cetuximab è simile per le cellule Caco-2 e HT-29.

Ad ogni modo è interessante che, in entrambe le linee, il trattamento del cetuximab attivava l'espressione del gene *TP53BP2* che codifica per SPP (proteina di stimolazione di p53), un membro della famiglia delle proteine d'interazione con p53 represso nel trattamento con EGF.

Il trattamento con cetuximab nelle cellule Caco-2 influenza la via del ciclo cellulare, come indicato dalla de-regolazione della ciclina A, ciclina H, p21 e p57 e dell'istone deacetilasi 2, mentre nelle cellule HT-29 influenza la via di segnalazione del calcio, correlata con l'attivazione di EGFR, come confermato dai geni *ITPR3* (recettore dell'inositolo 1,4,5 trifosfato) e *PLCD* (fosfolipasi C, delta 4).

Il gefitinib deregola notevolmente l'espressione di alcuni geni che sono sovra espressi nel trattamento di EGF, come la proteina 1 del soppressore di RAS, *RAB2A* (un membro della famiglia dell' oncogene *RAS*), *TACSTD1* (trasduttore tumore-collegato del segnale del calcio 1), *MOAP1* (modulatore dell' apoptosi 1), di *CDC42BPB* (chinasi proteica obbligatoria CDC42 beta), di *RAB5C* (un membro della famiglia dell' oncogene di RAS) e di *RASL12* (RAS-come la famiglia 12).

I dati ottenuti, oltre a fornirci una visione di insieme, e a farci approfondire lo studio del recettore EGFR e del suo ruolo nelle due linee di adenocarcinoma, in particolare ci hanno permesso di focalizzare la selezione dei candidati marcatori, bersagli specifici dell'EGFR, esclusivamente ai geni regolati nelle condizioni di accensione con EGF e spegnimento con cetuximab, escludendo tutti quei geni che potevano variare a causa di un effetto aspecifico correlato all'utilizzo dei farmaci.

Stiamo organizzando le reazioni di real-time per cercare di quantificare i geni candidati.

La difficoltà maggiore è trovare un livello di soglia sopra il quale possiamo accertare la presenza del cancro. La lista di candidati risulta interessante, perché tra i geni individuati figura la citocheratina 17 (*CK17*), che in recenti lavori è stata indicata come un possibile marcatore per il cancro mammario e per il carcinoma a cellule squamose della laringe nonché per l'identificazione delle micrometastasi [101-104].

Inoltre risulta candidato il gene per la claudina-18, che appartiene alla famiglia delle claudine, responsabile dei legami nelle giunzioni strette. Recenti studi si sono concentrati sullo sviluppo di farmaci che hanno come bersaglio questa proteina, allo scopo di bloccare tutti i cancro epiteliali [105].

Anche il gene *ADAMTS12* che codifica per un membro della famiglia delle metallo proteinasi, enzimi coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare, e responsabili dell'invasività dei tumori, è uno dei candidati marcatori che riteniamo particolarmente

interessante. Infatti la proteina codificata è coinvolta nella regolazione dell'adesione cellulare, e conferisce resistenza alle cellule tumorali attraverso la sua attività proteolitica [106].

III-Parte

I microRNAs (miRNA) appartengono ad una classe di RNA regolatori non codificanti e sono largamente descritti come coinvolti nell'oncogenesi [107].

Grazie all'alta specificità di tessuto, numerosi lavori indicano nei microRNA un potenziale ruolo nell'identificazione del tumore primario, soprattutto nelle neoplasie laddove questa origine rimanga sconosciuta o incerta [108] un problema clinico importante. Studi di profili di espressione riescono a raggruppare tipi tumorali simili tra loro, molto più accuratamente rispetto ai profili di espressione genica basati su mRNA codificanti proteine [69]. Se a questo poi si aggiunge l'elevata stabilità dei microRNA maturi, anche in tessuti fissati ed inclusi in paraffina e nei liquidi corporei, queste piccole molecole diventano i marcatori ideali. Nonostante la loro scoperta sia molto recente, molti gruppi di ricerca hanno indirizzato i loro studi in questo senso, allo scopo di realizzare un test di screening non invasivo per il cancro del colon e non solo. Nel nostro studio, abbiamo voluto sviluppare un approccio sistematico per identificare i microRNA associati al primo stadio della progressione adenoma-carcinoma, che interessa la trasformazione da epitelio normale ad epitelio iper-proliferante.

Per fare questo ci siamo concentrati sull'oncosoppressore APC, la cui mutazione e perdita di funzione, è responsabile della cascata proliferativa cellulare, nell'epitelio del colon. APC infatti regola la degradazione della β -catenina, un fattore di trascrizione generalmente legato ai complessi di caderine dei legami cellulari, ma quando è mutata, come si osserva nella formazione dei polipi, la β -catenina si accumula nel citosol e trasloca nel nucleo,

dove attiva in maniera incontrollata l'espressione di oncogeni come c-Myc e ciclina-D, che spingono la cellula a ripetute mitosi [109]. Nelle cellule HT-29 questa via è molto attiva, poiché il gene APC è subito delle mutazioni, che fanno perdere alla proteina codificata la capacità di controllo di β -catenina, e quindi della proliferazione. Le cellule HT-29-APC gentilmente concessa da Volgestein, abbiamo ripristinato l'espressione dell'APC non mutato e mediante microarray abbiamo misurato l'espressione dei microRNA che variavano, prima e dopo la sua espressione. Le cellule HT-29-APC sono infatti una linea trasformata stabilmente con APC posto sotto il controllo di un promotore inducibile da metallo. In seguito a trattamento con zinco queste cellule esprimono già dopo 24 ore la forma selvatica di APC, che ci consente di studiare la cascata di geni associati. La forma inducibile e transiente di APC, è l'unico modo per studiare questa proteina, la sua espressione infatti, a tempi prolungati o in una forma stabile è incompatibile con la vita nelle cellule tumorali, e il suo ripristino è infatti capace di spingere le cellule in apoptosi [111].

Analisi Western blot ci confermavano l'espressione dell'APC completo in seguito all'induzione con zinco e quindi la validità del nostro modello sperimentale.

La lista dei microRNA sovra-rappresentati dall'attivazione di APC risultava interessante, tra questi infatti abbiamo identificato il cluster oncogenico miR-17-92, già descritto come bersaglio di c-Myc, e quindi per via indiretta anche di β -catenina [109] e APC. Questa famiglia già descritta nella cascata di APC e c-Myc, validava i risultati dei microarray, e rendeva i nostri risultati più solidi e coerenti con la letteratura.

Nel nostro studio, esclusa la famiglia di miR-17 perché non target diretto di APC, ci siamo concentrati sulla famiglia miR-200, il cui rapporto di espressione diminuiva dopo 24 ore di induzione di APC. In recentissimi lavori, questa famiglia di microRNA è descritta come cluster epiteliale, responsabile del controllo dell'espressione delle caderine a livello

cellulare nelle cellule epiteliali e della transizione epitelio mesenchima in linee di cancro del colon [111-112]. Il suo meccanismo d'azione si sviluppa nell'inibizione, per ibridazione semplice watson e crick, dei repressori delle caderine ZEB1 e ZEB2.

Garantendo alle cellule che lo esprimono un fenotipo epiteliale.

Analisi di western blot su c-Myc ci hanno mostrato un suo calo a 24 ore in seguito all'espressione di APC, questo dato è coerente con il calo della famiglia miR-17-92, accertato bersaglio di c-Myc. L'effetto su miR-200, invece, ipotizziamo sia dovuto ad un legame diretto della beta catenina, principale effettore di APC. Per due ragioni: in primo luogo studi sul blocco selettivo di c-Myc non mostrano l'identificazione di questa famiglia da noi individuata [110] e in secondo luogo, studi del promotore di miR-200 mostrano due ipotetici siti di legame del complesso trascrizionale TCF4/Lef, legato da β -catenina, localizzati in un'isola CpG e molto vicino da uno dei siti ipotetici di inizio della trascrizione. La presenza di regioni ricche in CG (isole CpG) in tratti genomici è caratteristica di regioni associate a geni, dove hanno funzione di regolazione.

Ad ogni modo con analisi di Real time abbiamo definitivamente confermato i dati degli array, e lo spegnimento dell'espressione di tutti i membri di miR-200 in seguito ad induzione di APC che invece rimanevano invariati in cellule di controllo HT-29-GAL.

Inifine, ci siamo avvalsi di una linea cellulare diversa, le HEK-293, che non mostrano espressione di miR-200. Queste cellule sono facilmente trasfettabili, e con un'alta resa di trasferimento del DNA plasmidico. Abbiamo sfruttato un plasmide contenente il gene della β -catenina, nella forma non fosforilabile e quindi non degradabile da APC. A concentrazioni diverse di β -catenina, mediante Northern blot, si osservava un drastico aumento di uno dei membri di questa famiglia. Questo ultimo dato, ci forniva il legame diretto dell'attivazione di miR-200 da parte di β -catenina.

Il prossimo approccio sarà la quantificazione dell'espressione di questi microRNA per mezzo di RT-PCR quantitativa nel sangue di pazienti affetti da cancro del colon e di controlli sani. Al momento della stesura della tesi stiamo provvedendo a realizzare le PCR real time sul sangue periferico di pazienti con cancro del colon. Va ricordato che se il range di espressione di questi miRNA è troppo basso, la tecnica diventa meno accurata, per ovviare a questo artefatto stiamo facendo un'attenta selezione dei pazienti a stadi metastatici avanzati, III e IV, che la letteratura descrive come caratterizzati da un alto numero di cellule tumorali circolanti. A questo associamo un arricchimento della componente nucleata nel sangue, per mezzo di lisi osmotica degli eritrociti.

Tutto ciò per individuare sperimentalmente un valore soglia di espressione dei microRNA identificati, predittivo, al fine di aumentare l'accuratezza della tecnica.

La via dei marcatori ematici rimane un campo da investigare e intraprendere in questo momento di grande sviluppo molecolare e biotecnologico. Queste prospettive dovrebbero senza dubbio incoraggiare ulteriori studi e sperimentazioni.

Appendice

Appendice I. Geni sovra-espressi e sotto-espressi nei trattamenti con cetuximab. EGF e gefitinib.

Tattamento	Gene	Descrizione
Sottoespressi da cetuximab	USMG5	Upregulated during skeletal muscle growth 5 homolog (mouse)
	URG4	Up-regulated gene 4
	ATP5L	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G
	MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3
	SIN3B	SIN3 homolog B, transcription regulator (yeast)
	GPR27	G protein-coupled receptor 27
	LOC152217	Hypothetical protein BC007882
	KIF1A	Kinesin family member 1A
	C14orf2	Chromosome 14 open reading frame 2
	RPS23	Ribosomal protein S23
	KIAA0644	KIAA0644 gene product
	C12orf34	Chromosome 12 open reading frame 34
	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
	BCAS3	Breast carcinoma amplified sequence 3
	CYC1	Cytochrome c-1
	C19orf56	Chromosome 19 open reading frame 56
	MBP	Myelin basic protein
	MGC16121	Hypothetical protein MGC16121
	ATP5G1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)
	RPS6KB2	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2
	TMEM54	Transmembrane protein 54
	APBA3	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3 (X11-like 2)
	C2orf24	Chromosome 2 open reading frame 24
	TMEM18	Transmembrane protein 18
	PEG10	Paternally expressed 10
	AP2S1	Adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit
	SERF2	Small EDRK-rich factor 2
	FBLN1	Fibulin 1
	HSH2D	Hematopoietic SH2 domain containing
	ATP5E	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit
	FOXB1	Forkhead box B1
	HINT1	Histidine triad nucleotide binding protein 1
	LY6G6C	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C
	CHCHD6	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6
Sovraespressi da cetuximab	NLK	Nemo-like kinase
	NAT1	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
	MGC13057	Hypothetical protein MGC13057
	PPP3CB	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, beta isoform
	SERPING1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
	LGTN	Ligatin
	NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
	ACVR1	Activin A receptor, type I
	ARMC5	Armadillo repeat containing 5
	TM9SF3	Transmembrane 9 superfamily member 3
	CDC42BPB	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)

	CSDE1	Cold shock domain containing E1, RNA-binding
	SRA1	Steroid receptor RNA activator 1
	GALR1	Galanin receptor 1
	CASC5	Cancer susceptibility candidate 5
	STK38	Serine/threonine kinase 38
	C11orf57	Chromosome 11 open reading frame 57
	MTA1	Metastasis associated 1
	SCAMP4	Secretory carrier membrane protein 4
	ZMAT3	Zinc finger, matrin type 3
	RORB	RAR-related orphan receptor B
	WDR1	WD repeat domain 1
	FADS2	Fatty acid desaturase 2
	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
		MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)
	MCM3APAS	associated protein antisense
	TARBP2	Tar (HIV-1) RNA binding protein 2
	COG4	Component of oligomeric golgi complex 4
	RFX3	Regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)
	SHOX	Short stature homeobox
	BACE1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1
	HARS	Histidyl-tRNA synthetase
	PAH	Phenylalanine hydroxylase
	NIPBL	Nipped-B homolog (Drosophila)
	OS9	Amplified in osteosarcoma
	AHI1	Abelson helper integration site 1
	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
Sottoespressi da gefitinib	NACA	Nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide
	RPL7A	Ribosomal protein L7a
	TACSTD1	Tumor-associated calcium signal transducer 1
	ARF4	ADP-ribosylation factor 4
	ULBP3	UL16 binding protein 3
	RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family
	ILF2	Interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa
	RGS6	Regulator of G-protein signalling 6
	TARBP2	Tar (HIV-1) RNA binding protein 2
	EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2
	NOP5/NOP58	Nucleolar protein NOP5/NOP58
	INA	Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha
		Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase
	YWHAE	activation protein, epsilon polypeptide
	GALR1	Galanin receptor 1
	ISL1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)
	EIF4A1	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1
	ZMAT2	Zinc finger, matrin type 2
	HNRPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
	GNAS	GNAS complex locus
	CDC42BPB	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)
	RSU1	Ras suppressor protein 1
	C2orf25	Chromosome 2 open reading frame 25
	RASL12	RAS-like, family 12
	EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	CAPN10	Calpain 10
	TSKS	Testis-specific kinase substrate
	ATP6V1G2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2

YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
TTC1	Tetratricopeptide repeat domain 1
APOA5	Apolipoprotein A-V
DPM1	Dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit
PCBD2	Pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 2
CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)
ADSS	Adenylosuccinate synthase
ATP5A1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
SCFD1	Sec1 family domain containing 1
VPS4B	Vacuolar protein sorting 4 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
MMAB	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type
BPTF	Bromodomain PHD finger transcription factor
HARS	Histidyl-tRNA synthetase
OTUD5	OTU domain containing 5
C9orf7	Chromosome 9 open reading frame 7
KIAA0737	KIAA0737
GNPAT	Glyceronephosphate O-acyltransferase
MGAT2	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
CSDE1	Cold shock domain containing E1, RNA-binding
POGK	Pogo transposable element with KRAB domain
MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
KRT10	Keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)
ITPR3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3
TCOF1	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase
NFATC2IP	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein
PSMB10	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10
RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)
LAMB3	Laminin, beta 3
UBE2E3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
CDC2L2	Cell division cycle 2-like 2 (PITSLRE proteins)
UGCGL1	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
LAIR2	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
MOAP1	Modulator of apoptosis 1
SLC15A2	Solute carrier family 15 (H ⁺ /peptide transporter), member 2
HSDL1	Hydroxysteroid dehydrogenase like 1
LGTN	Ligatin
PAX3	Paired box gene 3 (Waardenburg syndrome 1)
SGCG	Sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SLC25A31	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 31

Sovraespressi da gefitinib	PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
	THRAP5	Thyroid hormone receptor associated protein 5
	TIAL1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1
	TOP2B	Topoisomerase (DNA) II beta 180kDa
	MRPL3	Mitochondrial ribosomal protein L3
	GRHPR	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase
	PSMD13	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13
	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
	ADNP	Activity-dependent neuroprotector
	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1
	ATP5L	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G
	AMAC1L2	Acyl-malonyl condensing enzyme 1-like 2
	SLAMF1	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1
	KCNG2	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2
	ALF	TFIIA-alpha/beta-like factor
	LTBP4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4
	PHLDB1	Pleckstrin homology-like domain, family B, member 1
	SLC32A1	Solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1
	RNF135	Ring finger protein 135
	CRB1	Crumbs homolog 1 (Drosophila)
	OTP	Orthopedia homolog (Drosophila)
	ADAMTS14	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 14
	CDC42EP4	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4
	SIX1	Sine oculis homeobox homolog 1 (Drosophila)
	TAOK2	TAO kinase 2
	FAM3A	Family with sequence similarity 3, member A
	ZNF592	Zinc finger protein 592
	RPS23	Ribosomal protein S23
	PRSS27	Protease, serine 27
	APOBEC2	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2
	KIF2C	Kinesin family member 2C
	C12orf44	Chromosome 12 open reading frame 44
	HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
	TPCN1	Two pore segment channel 1
	ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6
	SGK2	Serum/glucocorticoid regulated kinase 2
	TFE3	Transcription factor binding to IGHM enhancer 3
	SERF2	Small EDRK-rich factor 2
	SP2	Sp2 transcription factor
	EPN3	Epsin 3
	ISG20L2	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa-like 2
	SCO1	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1 (yeast)
	HSPC171	HSPC171 protein
	BCAS3	Breast carcinoma amplified sequence 3
	FLYWCH1	FLYWCH-type zinc finger 1
	KCNH2	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
	TMEM161A	Transmembrane protein 161A
	TBC1D13	TBC1 domain family, member 13
	RNASEH2A	Ribonuclease H2, subunit A

EDG8	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8
ITFG2	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 2
TMEM35	Transmembrane protein 35
CHD6	Chromodomain helicase DNA binding protein 6
CRELD2	Cysteine-rich with EGF-like domains 2
WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A
RASSF7	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 7
ZNF160	Zinc finger protein 160
POLR1E	Polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa
CCRK	Cell cycle related kinase
IQSEC3	IQ motif and Sec7 domain 3
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
FLJ20433	Hypothetical protein FLJ20433
MSI2	Musashi homolog 2 (Drosophila)
TSC22D2	TSC22 domain family, member 2
PCMTD2	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2
TCP10L	T-complex 10 (mouse)-like
ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family
KLK11	Kallikrein-related peptidase 11
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
SNRPB	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1
C5orf32	Chromosome 5 open reading frame 32
SUSD4	Sushi domain containing 4
ADM2	Adrenomedullin 2
SPRY4	Sprouty homolog 4 (Drosophila)
SGCA	Sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)
ZNF206	Zinc finger protein 206
C2orf24	Chromosome 2 open reading frame 24
IGSF9B	Immunoglobulin superfamily, member 9B
ZNF703	Zinc finger protein 703
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
LGP2	Likely ortholog of mouse D11lgp2
OAZ3	Ornithine decarboxylase antizyme 3
DUS3L	Dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
AP1GBP1	AP1 gamma subunit binding protein 1
UBA52	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
TMEM54	Transmembrane protein 54
SUPT3H	Suppressor of Ty 3 homolog (S. cerevisiae)
MRPL53	Mitochondrial ribosomal protein L53
ZC3H12A	Zinc finger CCCH-type containing 12A
BMP10	Bone morphogenetic protein 10
C12orf43	Chromosome 12 open reading frame 43
SLC29A2	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2
INCENP	Inner centromere protein antigens 135/155kDa
LOC554223	Hypothetical LOC554223
DKFZP434O047	DKFZP434O047 protein
FGF21	Fibroblast growth factor 21
OTOF	Otoferlin
ARHGEF11	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11
FAM124B	Family with sequence similarity 124B

Sottoespressi da EGF	MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4
	SUV420H2	Suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila)
	TTC15	Tetratricopeptide repeat domain 15
	ATP6V1G2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G
	ZNF407	Zinc finger protein 407
	NUP43	Nucleoporin 43kDa
	EXOC6B	Exocyst complex component 6B
	PNN	Pinin, desmosome associated protein
	TBX19	T-box 19
	INA	Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha
	PLA2G1B	Phospholipase A2, group IB (pancreas)
	TRIM5	Tripartite motif-containing 5
		Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 31
	SLC25A31	
	NFATC2IP	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein
	ARMC5	Armadillo repeat containing 5
	ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
	LAIR2	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2
	LAMC3	Laminin, gamma 3
	PCNT	Pericentrin (kendrin)
	ZMAT3	Zinc finger, matrin type 3
	RERE	Arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats
	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
	ADAM30	ADAM metalloproteinase domain 30
	APOBEC1	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
	APOB	Apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)
	DYRK1A	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A
	POLR3G	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)
	DDEF1	Development and differentiation enhancing factor 1
	TACSTD1	Tumor-associated calcium signal transducer 1
	DNAJC1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1
	MYPN	Myopalladin
	SPAG9	Sperm associated antigen 9
	C12orf11	Chromosome 12 open reading frame 11
	GPMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb
	UBE2D1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast)
	HAS2	Hyaluronan synthase 2
	MMAB	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type
	DKFZp434N035	Hypothetical protein DKFZp434N035
	ENPEP	Glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)
	AGXT2L1	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1
	ZNF432	Zinc finger protein 432
	SDC1	Syndecan 1
	CABLES2	Cdk5 and Abl enzyme substrate 2
	CDC42BPB	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)
	MLN	Motilin
	GALR1	Galanin receptor 1
	PSG9	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9
	TXNIP	Thioredoxin interacting protein
	PASK	PAS domain containing serine/threonine kinase
	HGSNAT	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
	CTSL1	Cathepsin L
	CRSP3	Cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 3,

	130kD
GOLPH4	Golgi phosphoprotein 4
ARG1	Arginase, liver
AHI1	Abelson helper integration site 1
ENO1	Enolase 1, (alpha)
ARF4	ADP-ribosylation factor 4
DYRK3	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
HIATL2	Hippocampus abundant gene transcript-like 2
	Pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
PLEKHF2	
TARBP2	Tar (HIV-1) RNA binding protein 2
SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)
SAP30	Sin3A-associated protein, 30kDa
NR2E3	Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3
SLC41A2	Solute carrier family 41, member 2
PTPN2	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
SAMD4A	Sterile alpha motif domain containing 4°
RPL7A	Ribosomal protein L7a
EHD4	EH-domain containing 4
PEPP-2	PEPP subfamily gene 2
SKIP	Skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase
RPP40	Ribonuclease P 40kDa subunit
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
MGC15705	Hypothetical protein MGC15705
PCDHGC3	Protocadherin gamma subfamily C,
PVRL4	Poliovirus receptor-related 4
PAIP1	Poly(A) binding protein interacting protein 1
TCEA2	Transcription elongation factor A (SII), 2
NRG1	Neuregulin 1
MAP4K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
ARMC10	SVH protein
JAM3	Junctional adhesion molecule 3
IFNA17	Interferon, alpha 17
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
DAB1	Disabled homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
ISL1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1
TMED2	Transmembrane emp24 domain trafficking protein 2
CHES1	Checkpoint suppressor 1
NACA	Nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide
OS9	Amplified in osteosarcoma
PGK2	Phosphoglycerate kinase 2
MYO18B	Myosin XVIIIIB
MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)
TSPAN13	Tetraspanin 13
MAGEA10	Melanoma antigen family A, 1
RTCD1	RNA terminal phosphate cyclase domain 1
ILF2	Interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa
KIAA1546	KIAA1546
	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, beta isoform
PPP2R2B	
SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
SAC	Testicular soluble adenylyl cyclase
RGS6	Regulator of G-protein signalling 6
SLC15A2	Solute carrier family 15 (H ⁺ /peptide transporter), member 2

DCC	Deleted in colorectal carcinoma
RAB11FIP3	RAB11 family interacting protein 3 (class II)
IER2	Immediate early response 2
ZNF638	Zinc finger protein 638
CRAT	Carnitine acetyltransferase
PAX3	Paired box gene 3 (Waardenburg syndrome 1)
PEX1	Peroxisome biogenesis factor 1
KIF26A	Kinesin family member 26A
RPS2	Ribosomal protein S2
SPG3A	Spastic paraplegia 3A (autosomal dominant)
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
PDHB	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
	Fascin homolog 3, actin-bundling protein, testicular
FSCN3	(Strongylocentrotus purpuratus)
NUMB	Numb homolog (Drosophila)
PLS3	Plastin 3 (T isoform)
TCP11	T-complex 11 (mouse)
LRRFIP1	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
MATR3	Matrin 3
PAH	Phenylalanine hydroxylase
ADH7	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
C14orf11	Chromosome 14 open reading frame 11
ACTR3B	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)
HPCAL4	Hippocalcin like 4
ACVR1B	Activin A receptor, type IB
ITGB3BP	Integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)
PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
MATR3	Matrin 3
CSDA	Cold shock domain protein A
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor alpha
ANXA5	Annexin A5
TSPAN3	Tetraspanin 3
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1
BLK	B lymphoid tyrosine kinase
RAD54L2	RAD54-like 2 (S. cerevisiae)
METAP2	Methionyl aminopeptidase 2
PRKAA2	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
DNAH9	Dynein, axonemal, heavy chain 9
MGC10955	Hypothetical protein MGC10955
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7
TEF	Thyrotrophic embryonic factor
ZNF140	Zinc finger protein 140
RARB	Retinoic acid receptor, beta
NPAS2	Neuronal PAS domain protein 2
BHMT	Betaine-homocysteine methyltransferase
CRISPLD2	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2
REEP6	Receptor accessory protein 6
TFCP2	Transcription factor CP2
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3
AHI1	Abelson helper integration site 1
SCG2	Secretogranin II (chromogranin C)
PLD1	Phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
	Pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of
PCBD2	hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 2
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric

	dwarfism
ASH1L	Ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila
HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase
GNAS	GNAS complex locus
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase
YWHAZ	activation protein, zeta polipeptide
ING5	Inhibitor of growth family, member 5
ZNF254	Zinc finger protein 254
GRIN1	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
ANLN	Anillin, actin binding protein
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1
TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase
YWHAQ	activation protein, theta polypeptide
BARX2	BarH-like homeobox 2
EIF1AY	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked
PLAG1	Pleiomorphic adenoma gene 1
SNX4	Sorting nexin 4
MGC4655	Hypothetical protein MGC4655
CDC7	Cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae)
FUCA1	Fucosidase, alpha-L- 1, tissue
	Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce
PDE4B	homolog, Drosophila)
HARS	Histidyl-tRNA synthetase
ACPP	Acid phosphatase, prostate
GATA3	GATA binding protein 3
HPS3	Hermansky-Pudlak syndrome 3
TPST2	Tyrosylprotein sulfotransferase 2
ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
GTF2I	General transcription factor II, i
ACTR8	ARP8 actin-related protein 8 homolog (yeast)
OSBPL1A	Oxysterol binding protein-like 1A
TNP1	Transition protein 1 (during histone to protamine replacement)
HIF1AN	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor
CCDC47	Coiled-coil domain containing 47
RPS6KA5	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5
SLC22A6	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6
MYO5A	Myosin VA (heavy chain 12, myoxin)
VAT1	Vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)
TCEA1	Transcription elongation factor A (SII), 1
ACOX3	Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl
LBX1	Ladybird homeobox homolog 1 (Drosophila)
C9orf77	Chromosome 9 open reading frame 77
PIGQ	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q
CRKRS	Cdc2-related kinase, arginine/serine-rich
NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1
	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix
HIF1A	transcription factor)
DHX16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16
SNX4	Sorting nexin 4
MYF6	Myogenic factor 6 (herculin)
TBC1D23	TBC1 domain family, member 23
Sovraespressi da LFNG	O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase

SEPT7	Septin 7
C19orf53	Chromosome 19 open reading frame 53
FRS3	Fibroblast growth factor receptor substrate 3
HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
CDH4	Cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal)
LRP6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
APH1B	Anterior pharynx defective 1 homolog B (<i>C. elegans</i>)
RAB2B	RAB2B, member RAS oncogene family
ELOF1	Elongation factor 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
FAM124B	Family with sequence similarity 124B
GDPD3	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3
FAT	FAT tumor suppressor homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
TSEN34	TRNA splicing endonuclease 34 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
SUPT3H	Suppressor of Ty 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
ANAPC11	APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)
HERC6	Hect domain and RLD 6
	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
NFKB2	
RBPMS	RNA binding protein with multiple splicing
C1orf51	Chromosome 1 open reading frame 51
	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C
SEMA6C	
EFS	Embryonal Fyn-associated substrate
RPS6KB2	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2
	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence-like 1
CBLL1	
PGBD5	PiggyBac transposable element derived 5
SPINK1	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
KIAA0427	KIAA0427
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
FAM70A	Family with sequence similarity 70, member A
SPRR1B	Small proline-rich protein 1B (cornifin)
INTS7	Integrator complex subunit 7
ZMIZ2	Zinc finger, MIZ-type containing 2
CTA-216E10.6	Hypothetical protein FLJ23584
DEFB119	Defensin, beta 119
YIF1A	Yip1 interacting factor homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
SLC29A2	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2
CABIN1	Calcineurin binding protein 1
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
C19orf56	Chromosome 19 open reading frame 56
OTUB2	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2
KRT32	Keratin 32
SCO1	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1 (yeast)
RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family
ASXL2	Additional sex combs like 2 (<i>Drosophila</i>)
KCNG2	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2
PJA1	Praja 1
TXNL5	Thioredoxin-like 5
BTN2A3	Butyrophilin, subfamily 2, member A3
RAD9A	RAD9 homolog A (<i>S. pombe</i>)
ABCC10	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10
TUSC2	Tumor suppressor candidate 2

TCP10L	T-complex 10 (mouse)-like
RPP21	Ribonuclease P 21kDa subunit
CRYAA	Crystallin, alpha A
FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa
LRRC8A	Leucine rich repeat containing 8 family, member A
ATP5G1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)
HPS6	Hermansky-Pudlak syndrome 6
CDC42EP4	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4
DDX54	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54
AP2S1	Adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit
JARID2	Jumonji, AT rich interactive domain 2
RPS23	Ribosomal protein S23
MTCH2	Mitochondrial carrier homolog 2 (C. elegans)
CUTA	CutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)
PNPLA5	Patatin-like phospholipase domain containing 5
MARCH5	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 5
TRIM47	Tripartite motif-containing 47
HMCN1	Hemicentin 1
SLC12A7	Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 7
BCL7C	B-cell CLL/lymphoma 7C
PLXNB1	Plexin B1
DLGAP3	Discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 3
WDR67	WD repeat domain 67
CENTD3	Centaurin, delta 3
TUB	Tubby homolog (mouse)
IGF2AS	Insulin-like growth factor 2 antisense
SERF2	Small EDRK-rich factor 2
PITPNM1	Phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1
PPAN	Peter pan homolog (Drosophila)
FAM55D	Family with sequence similarity 55, member D
SNRPB	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1
NRIP2	Nuclear receptor interacting protein 2
IGSF9B	Immunoglobulin superfamily, member 9B
FNDC3B	Fibronectin type III domain containing 3B
GDF10	Growth differentiation factor 10
GSTO1	Glutathione S-transferase omega 1
YIPF3	Yip1 domain family, member 3
ATP11A	ATPase, Class VI, type 11A
POLR1E	Polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa
PLEKHA5	Pleckstrin homology domain containing, family A member 5
GPR88	G protein-coupled receptor 88
PTCHD2	Patched domain containing 2
MTA1	Metastasis associated 1

Geni selezionati per p-values < 0.05 and a rapporto di espressione trattato su non trattato \geq almeno

2 (sovraespresso) o inferiore a ½ (sottoespresso) in entrambe le linee cellulari. E = Fattore di crescita epidermico 10 nM; Cx10 = cetuximab 10 nM; Gb = gefitinib 1µmol/L;

Bibliografia

- [1] Schoen RE. **The case for population-based screening for colorectal cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2(1): 65-70, 2002.
- [2] De Angelis R, Grande E, Inghelmann R, Francisci S, Micheli A, Baili P, Meneghini E, Capocacci R, Verdecchia A. **Cancer prevalence estimates in Italy from 1970 to 2010.** 2008
- [3] Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. **The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer.** *Cancer.* 15;88(10):2398-424, 2000.
- [4] Kinzler KW, Vogelstein. **Lessons from hereditary colorectal cancer.** *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159-70. Review.
- [5] McDonald SA, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA, Jankowski JA. **Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer.** *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006 May;3(5):267-74. Review. PMID: 16673006
- [6] Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulsom R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, Wright NA. **Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission.** *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3819-25.1: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 27; 98(5):2640-5. Epub 2001 Feb 20.
- [7] Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B. **Top-down morphogenesis of colorectal tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 27;98(5):2640-5. Epub 2001 Feb 20.
- [8] Herrera, L., Kakati, S., Gibas, L., Pietrzak, E., and Sandberg, A (1986). **Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q.** *Am. J. Med. Genet.* 25, 473–476.
- [9] Szabo, C.I., and King, M.C. **Inherited breast and ovarian cancer.** *Hum. Mol. Genet.* 4, 1811–1817. 1995.
- [10] Jen, J., Powell, S.M., Papadopoulos, N., Smith, K.J., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. **Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions.** *Cancer Res.* 54, 5523–5526. 1994.
- [11] Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G.-H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M., Toyoshima, K., and, Akiyama, T. **Binding of APC to the human**

homolog of the of drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science* 272,1020-1023. 1996.

[12] Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H.,Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. **Association of the APC gene product with beta-catenin.** *Science* 262, 1731–1734. 1993.

[13] Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis,P.**Binding of GSK3-beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.** *Science* 272, 1023–1025. 1996.

[14] Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H. **Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1.** *Science*. 1999 Sep 17; 285(5435):1923-6.

[15]. DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E, Jamora C. **Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development.** *Nature*. 2003 Mar 20;422(6929):317-22. Erratum in: *Nature*. 2003 Aug 21;424(6951):974.

[16]. Yarden Y, Sliwkowski M: **Untangling the ErbB signalling network.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127–37.

[17]. Rowinsky EK. **The erbB family: Targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors.** *Annu Rev Med* 2004, 55:433-57.

[18]. Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G: **Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets.** *Eur J Cancer* 2006, 42:290-4.

[19]. Dassonville O, Bozec A, Fischel JL, Milano G: **EGFR targeting therapies: Monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors Similarities and differences.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2007, 62:53-61.

[20]. Baselga J: **Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy.** *Oncologist* 2002, 7:2-8.

[21]. Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T: **Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway.** *Clin Cancer Res* 2006, 12:7222-31.

- [22]. Mendelsohn J: **Blockade of receptors for growth factors: an anticancer therapy--the fourth annual Joseph H Burchenal American Association of Cancer Research Clinical Research Award Lecture.** *Clin Cancer Res* 2000, 6:747-53
- [23]. Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, Guzman M, Rodriguez S, Arribas J, Palacios J, Baselga J: **Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting.** *Clin Cancer Res* 2004,10:6487-501. The Howard Hughes Medical Institute, Johns Hopkins Oncology Center, Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD 21231, USA.
- [24] Kramer BS, Gohagan JK, Prorok PC. **Cancer screening: theory and practice.** Marcel Dekker, New York (criteria del test), 1999.
- [25] Lang CA, Ransohoff DF. **What can we conclude from the randomized controlled trials of fecal occult blood test screening?** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 10(3):199-204,1998.
- [26] Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS, Marcus PM. **Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality.** *J Natl Cancer Inst.* 21;84(20):1572-5, 1992.
- [27] Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP Jr, Weiss NS. **A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer.** *N Engl J Med.* 5;326(10):653-7, 1992.
- [28] Levin TR, Palitz A, Grossman S, Conell C, Finkler L, Ackerson L, Rumore G, Selby JV. **Predicting advanced proximal colonic neoplasia with screening sigmoidoscopy.** *JAMA.* 5;281(17):1611-7, 1999.
- [29] Rex DK, Johnson DA, Lieberman DA, Burt RW, Sonnenberg A. **Colorectal cancer prevention 2000: screening recommendations of the American College of Gastroenterology.** *American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol.* 95(4):868-77, 2000.
- [30] Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ahlquist DA, Nelson H, MacCarty RL, Harmsen WS, Ilstrup DM. **Detection of colorectal polyps with CT colography: initial assessment of sensitivity and specificity.** *Radiology.* 205(1):59-65, 1997.
- [31] Lambrechts AC, Van't Veer LJ, Rodenhuis S. **The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: use, limitations and future of RNA-based methods.** *Ann Oncol.* 9(12):1269-76, 1998.

- [32] F.C. Kelleher, D. Fennelly, M. Rafferty. **Common critical pathways in embryogenesis and cancer**, *Acta Oncol.* 45 375–388, 2006
- [33] Guadagni F, Kantor J, Aloe S, Carone MD, Spila A, D'Alessandro R, Abbolito MR, Cosimelli M, Graziano F, Carboni F, Carlini S, Perri P, Sciarretta F, Greiner JW, Kashmiri SV, Steinberg SM, Roselli M, Schlom J. **Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers**, *Cancer Res.* 61(6):2523-32, 2001.
- [34] Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Spila A, Cavaliere F, Arcuri R, D'Alessandro R, Fracasso PL, Casale V, Vecchione A, Casciani CU, Greiner JW, Schlom J. **Quantitative analysis of CEA expression in colorectal adenocarcinoma and serum: lack of correlation**. *Int J Cancer.* 17;72(6):949-54, 1997.
- [35] M. Novaes, I. Bendit, B. Garicochea, A. del Giglio, **Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors**, *Mol. Pathol.* 50 209–211, 1997.
- [36] Rozhkova NI, Bozhenko VK, Ploshnitsa AI, Tashchyan AA, Kudinova EA, Mazo ML. **Cytokeratin 19 mRNA concentration in lymph nodes as a diagnostic marker of metastases**. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Jan;145(1):90-2.
- [37] Spindler KL, Lindebjerg J, Nielsen JN, Olsen DA, Bisgård C, Brandslund I, Jakobsen A. **Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: a comparison of methods**. *Int J Oncol.* 2006 Nov;29(5):1159-65.
- [38] Gazzaniga P, Gradilone A, Frati L, Aglianò AM. **Epidermal growth factor receptor mRNA expression in peripheral blood of bladder cancer patients: a potential marker to detect treatment failure**. *Clin Cancer Res.* 7(12):4288-9, Dec 2001.
- [39] J. Chelly, J.P. Concordet, J.C. Kaplan, A. Kahn. **Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 2617–2621, 1989.
- [40] Ko Y, Grünewald E, Totzke G, Klinz M, Fronhoffs S, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Vetter H. **High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: a model for the analysis of illegitimate gene expression**. *Oncology.* 59(1):81-8, Jun, 2000.

- [41] S. Mocellin, U. Keilholz, C.R. Rossi, D. Nitti. **Circulating tumor cells: the ‘leukemic phase’ of solid cancers**, Trends Mol. Med. 12 130–139, 2006
- [42] Liefers GJ, Tollenaar RA. **Cancer genetics and their application to individualised medicine**. Eur J Cancer. 2002 May;38(7):872-9.
- [43] C. Wittekind, M. Neid. **Cancer invasion and metastasis**, Oncology 69 (Suppl. 1) 14–16, 2005.
- [44] L. Kopfstein, G. Christofori. **Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment**, Cell. Mol. Life Sci. 63 449–468, 2006.
- [45] J.J. Christiansen, A.K. Rajasekaran. **Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis**, Cancer Res. 66 8319–8326, 2006
- [46] B. Willipinski-Stapelfeldt, S. Riethdorf, V. Assmann, U. Woelfle, T. Rau, G. Sauter, J. Heukeshoven, K. Pantel, **Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial–mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells**, Clin. Cancer Res. 11 8006–8014, 2005.
- [47] I.J. Fidler, **The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited**, Nat. Rev. Cancer 3 453–458, 2003.
- [48] K.J. Luzzi, I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers, A.C. Groom, **Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases**, Am. J. Pathol. 153 865–873, 1998.
- [49] L. Holmgren, M.S. O’Reilly, J. Folkman. **Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression**, Nat. Med. 1 149–153, 1995.
- [50] P. Hermanek, R.V. Hutter, L.H. Sobin, C. Wittekind. **International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis**, Cancer. 86 2668–2673, 1999.
- [51] T. Fehm, E.F. Solomayer, S. Meng, T. Tucker, N. Lane, J. Wang, G. Gebauer. **Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells**, Cytotherapy 7 171–185, 1995.

- [52] W.J. Allard, J. Matera, M.C. Miller, M. Repollet, M.C. Connelly, C. Rao, A.G. Tibbe, J.W. Uhr, L.W. Terstappen. **Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases**, Clin. Cancer Res. 10 6897– 6904, 2007.
- [53] S.A. Bustin, R. Mueller. **Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis**, Clin. Sci. (Lond.) 109 365–379, 2005.
- [54] I. Bartel, D. P. (2004) *Cell* **116**, 281–297.
- [55] Chin LJ, Slack FJ. **A truth serum for cancer-microRNAs have major potential as cancer biomarkers**. Cell Res. 18(10):983-4, Oct 2008.
- [56] Bartel PD. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function**. Cell 116: 281–297, 2004.
- [57] Bushati N, Cohen MS. **MicroRNA functions**. Annu Rev Cell Dev Biol 23: 175–205, 2007.
- [58] 11. Berezikov E, Plasterk HR. **Camels and zebrafish, viruses and cancer: a microRNA update**. Hum Mol Genet 14 Spec No. 2: R183–190, 2007.
- [59] Kim VN, Han J, Siomi MC. **Biogenesis of small RNAs in animals**, Nat Rev Mol Cell Biol. 10(2):126-39. Review. Feb, 2009.
- [60] Ghildiyal M, Zamore PD. **Small silencing RNAs: an expanding universe**, Nat Rev Genet. 10(2):94-108. Review. Feb 2009.
- [61] Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. **Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis**, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205, USA, Dec 2007.
- [62] Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. **Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster**. Nat Genet. 2006 Sep;38(9):1060-5. Epub, July 2006.
- [63] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. **c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression**, Nature. 9;435(7043):839-43. Jun 2005.

- [64] Calin GA, Croce CM. **MicroRNA signatures in human cancers**. Nat Rev Cancer. 6(11):857-66. Review. Nov 2006.
- [65] Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K. **Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells**. BMC Biotechnol 7: 36. Jun 2007.
- [66] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. **RAS is regulated by the let-7 microRNA family** Cell. 120(5):635-47. Mar 2005.
- [67] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM, Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA. **The colorectal microRNAome**. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 3687–3692. 2006.
- [68] Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. **Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines**, Department of Internal Medicine, Scott and White Clinic, Texas A&M University System Health Science Center College of Medicine, Temple, Texas 76508, USA.
- [69] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. **MicroRNA expression profiles classify human cancers**. Nature 435: 834–838, 2005.
- [70]. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A. **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets**. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 2257–2261, 2006.
- [71] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM. **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection**. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10513-10518. 2008.
- [72] Gilad S, Meiri E, Yagev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. **Serum microRNAs are promising novel biomarkers**. PLoS ONE. 5;3(9):e3148. Sep 2008.
- [73] Davis LG, Kuehl, WM, and Battey JF. **Basic methods in molecular Biology**. II ed., Appleton & Lange, Norwalk. 1994.

- [74] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. **Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR**, *Nucleic Acids Res.* 27; 33(20):e179. Nov 2005.
- [75] Engels, W. R. **Contributing software to the internet: the Amplify program**. *Trends Biochem. Sci.* 18: 448-450 (1993).
- [76]. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *J Immunol Methods* 65:55–63. 1983.
- [77]. Freshney R: **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. *New York :Liss*,
- [78] Smyth GK: **Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments**. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*. No. 1, Article 3. 2004.
- [78] Smyth GK. **Limma: linear models for microarray data**. In: **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**. Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds.), *New York:Springer*, 397-420p. 2005.
- [79] Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M: **From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG**. *Nucleic Acids Res.* 2006.
- [80] Manoli T, Gretz N, Gröne HJ, Kenzelmann M, Eils R, Brors B: **Group testing for pathway analysis improves comparability of different microarray datasets**. *Bioinformatics* 22:2500-6. 2006.
- [81] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW: **Detection and characterization of carcinoma cells in the blood**. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:4589-4594. 2008
- [82] Ashworth TR: **A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death**. *Aus Med J* 1869,14:146-149
- [83]. Pinheiro NA, Caballero OL, Soares F, Reis LF, Simpson AJ: **Significant overexpression of oligophrenin-1 in colorectal tumors detected by cDNA microarray analysis**. *Cancer Lett* 172:67-73. 2001.

- [84] Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ: **Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling.** J Natl Cancer Inst, 94:513-521. 2002.
- [85] Mitsui S, Okui A, Kominami K, Konishi E, Uemura H, Yamaguchi N: **A novel serine protease highly expressed in the pancreas is expressed in various kinds of cancer cells.** FEBS J 272:4911-4923. 2005.
- [86] Bustin SA, Mueller R: **Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer.** Mol Aspects Med. 2006, 27:192-223
- [87]. Lassmann S, Bauer M, Soong R, Schreglmann J, Tabiti K, Nahrig J, Ruger R, Hofler H, Werner M: **Quantification of CK20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter and intratumour heterogeneity.** J Pathol. 2002, 198:198-206.
- [88]. Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Grone J, Rokos F, Buhr HJ, Thiel E, Keilholz U: **Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers.** Int J Cancer. 2004, 108: 219-227.
- [89]. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE: **Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential.** Biotechniques. 1999, 26:112-122, 124-125
- [90]. Solmi R, De Sanctis P, Zucchini C, Ugolini G, Rosati G, Del Governatore M, Coppola D, Yeatman TJ, Lenzi L, Caira A, Zanotti S, Taffurelli M, Carinci P, Valvassori L, Strippoli P: **Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR.** Int J Oncol 2004, 25:1049-1056
- [92] Raynor M, Stephenson SA, Walsh DC, Pittman KB, Dobrovic A. **Optimisation of the RT-PCR detection of immunomagnetically enriched carcinoma cells,** BMC Cancer. 2002 May 24;2:14.
- [93] Hildebrandt M, Mapara MY, Körner IJ, Bargou RC, Moldenhauer G, Dörken B. **Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency.** Department of Medical Oncology and Tumor Immunology, Robert Rössle-Klinik, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Medical Faculty of the Humboldt University, Berlin, Germany.

- [95] De Luca A, Pignata S, Casamassimi A, D'Antonio A, Gridelli C, Rossi A, Cremona F, Parisi V, De Matteis A, Normanno N. **Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay**, Clin Cancer Res. 2000 Apr;6(4):1439-44.
- [96] Skvortsov S, kvortsov S, Skvortsova I, Sarg B, Loeffler-Ragg J, Lindner H, Lukas P, Tabernero J, Zwierzina H: **Irreversible pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 induces caspase-independent apoptosis in colorectal cancer DiFi cell line**. *Apoptosis* 2005 ,10:1175–86
- [97] Castillo L, Etienne-Grimaldi MC, Fischel JL, Formento P, Magne N, Milano G: **Pharmacological background of EGFR targeting**. *Ann Oncol* 2004,15:1007-12.
- [98] Skvortsov S, Sarg B, Loeffler-Ragg J, Skvortsova I, Lindner H, Werner Ott H, Lukas P, Illmensee K, Zwierzina H. **Different proteome pattern of epidermal growth factor receptor–positive colorectal cancer cell lines that are responsive and nonresponsive to C225 antibody treatment**. *Mol Cancer Ther* 2004 ,3:1551-58.
- [99] Loeffler-Ragg J, Skvortsov S, Sarg B, Skvortsova I, Witsch-Baumgartner M, Mueller D, Lindner H, Zwierzina H: **Gefitinib-responsive EGFR-positive colorectal cancers have different proteome profiles from non-responsive cell lines**. *Eur J Cancer* 2005 ,41:2338-46.
- [100] Cohen E, Ophir I, Ben Shaul Y: **Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line**. *J Cell Sci* 1999 ,112:2657-66.
- [101] Anderson JM, Balda MS, Fanning AS: **The structure and regulation of tight junctions**. *Curr Opin Cell Biol* 1993 ,5:772-8.
- [102] Schneeberger EE, Lynch RD: **Structure, function and regulation of cellular tight junctions**. *Am J Physiol* 1992 ,262:L647-61.
- [103] Liu ZB, Wu J, Ping B, Feng LQ, Shen ZZ, Shao ZM. **Expression of CK5/6 and CK17 and its correlation with prognosis of triple-negative breast cancer patients** 2008 Aug;30(8):610-4. PMID: 19102940
- [104] Wei KJ, Zhang L, Yang X, Zhong LP, Zhou XJ, Pan HY, Li J, Chen WT, Zhang ZY. **Overexpression of cytokeratin 17 protein in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo**, Oral Dis. 2009 Jan;15(1):111-7. Epub 2008 Nov 3.

- [105] Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, Huber C, Türeci O. **Splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development.** [Clin Cancer Res.](#) 2008 Dec 1;14(23):7624-34.
- [106] Llamazares M, Obaya AJ, Moncada-Pazos A, Heljasvaara R, Espada J, López-Otín C, CalS. **The ADAMTS12 metalloproteinase exhibits anti-tumorigenic properties through modulation of the Ras-dependent ERK signalling pathway.** *J Cell Sci.* 2007 Oct 15;120(Pt 20):3544-52. Epub 2007 Sep 25
- [107] Croce CM **Oncogenes and cancer.** *N Engl J Med.* 2008 Jan 31;358(5):502-11. Review. *Nat Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):462-9. Epub 2008 Mar 23.
- [108] Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol.* 2008 Apr; 26(4): 400-1.
- [109] He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. **Identification of c-MYC as a target of APC pathway,** Howard Hughes Medical Institute and Johns Hopkins Oncology Center, 424 North Bond Street, Baltimore, MD 21231, USA
- [110] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. **c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression.** *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):839-43.
- [111] Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. **Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 23;93(15):7950-4.
- [112] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. **The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1,** *Cell Biol.* 2008 May;10(5):593-601.
- [113] Korpel M, Kang Y. **The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis,** *Y.RNA Biol.* 2008 Jul-Sep;5(3):115-9.

Ringraziamenti

Sono grata alla "Fondazione Enzo Piccinini" e alla "Fondazione Elio Bisulli" che finanziano la ricerca sul cancro del colon nel nostro Laboratorio e che hanno inoltre supportato parzialmente il mio soggiorno di ricerca presso il Moffitt Cancer Center, Tampa, FL (USA).

Ringrazio il Moffitt Cancer Center and Research Institute, nelle persone del Prof. Coppola e Prof. Cheng.

Ringrazio per la lettura critica del manoscritto la dott.ssa Rossella Solmi e il Prof. Pierluigi Strippoli

Ringrazio per la lettura critica dei risultati e discussione il dott. Gabriele D'Uva.

Ringrazio il supporto tecnico nella stesura della bibliografia il sig. Veljko Mandic .